Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. W. S c h w e r d

ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DER GASCHROMATOGRAPHIE IN DER RECHTSMEDIZIN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gertrud L a n g h o f f
aus Osnabrück

Würzburg 1970

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. W. S c h w e r d

ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DER GASCHROMATOGRAPHIE IN DER RECHTSMEDIZIN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gertrud L a n g h o f f
aus Osnabrück

Würzburg 1970

Referent: Professor Dr. W. S c h w e r d

Tag der Promotion:

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Die Gaschromatographie	1
	1. Einleitung	1
	2. Prinzip und apparativer Aufbau	2
	3. Auswertungsmethoden	12
II.	Die Gaschromatographie in der Rechtsmedizin	14
	1. Bedeutung der Gaschromatographie für die Rechtsmedizin	14
	2. Zusammenstellung der Literaturübersicht	16
	3. Literaturübersicht	17
III.	Der gaschromatographische Nachweis von Histamin in der Rechtsmedizin	47
	1. Bedeutung des Histamins für die Rechtsmedizin	47
	2. Bisher angewendete Bestimmungsmethoden für Histamin	49
	3. Versuche zur Histaminbestimmung	50
	4. Diskussion der Anwendbarkeit der erarbeiteten Methode	57
IV.	Zusammenfassung	60
V.	Literaturangaben	61

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543527_0035

I. DIE GASCHROMATOGRAPHIE

1. EINLEITUNG

Bis in die Mitte des vorigen Jahrhunderts datieren die Anfänge der chromatographischen Technik, als nämlich 1850 der deutsche Chemiker RUNGE mit Hilfe der Kapillarwanderung auf Filtrierpapier anorganische Kationen trennte. Der Begriff "Chromatographie" ist allerdings erst seit dem historischen Versuch des russischen Botanikers TSWETT gebräuchlich, der im Jahre 1906 Extrakte von grünen Blättern mit einer Säule trennte, in der sich dann verschieden gefärbte Zonen bildeten. TSWETT konnte also als erster zeigen, daß sich Farbstoffe mit Hilfe der Wechselwirkung von physikalischen Oberflächenkräften zerlegen lassen, wobei dem Lösungsmittel nur Transportfunktionen zukommen.

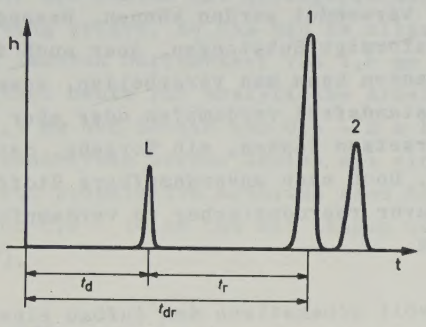
In den nachfolgenden Jahrzehnten wurde Tswetts Versuch die Grundlage für die Entwicklung der Säulen-, Papier- und Gaschromatographie. Über die letztgenannte berichteten 1941 zum ersten Mal MARTIN u. SYNGE, die auf die Trennmöglichkeit einer Gas-Flüssig-Chromatographie hinwiesen. Dieser Vorschlag wurde jedoch nicht weiter ausgearbeitet, bis 1952 die Arbeit von JAMES u. MARTIN über Gas-Flüssig-Chromatographie von Fettsäuren, und vorher 1951 die Arbeiten von CREMER u. PRIOR und CREMER u. MÜLLER über Gas-Fest-Chromatographie bekannt wurden. Seit dem Erscheinen der Arbeit von JAMES u. MARTIN (1952) nahm die Entwicklung der Gaschromatographie einen stürmischen Verlauf, anfangs mehr mit einem Schwerpunkt im Gebiet der Petrochemie, dann aber doch immer stärker in die Bereiche der Biochemie hineinreichend, so daß die Gaschromatographie heute im biochemischen Labor zu einem unentbehrlichen analytischen Verfahren geworden ist.

2. PRINZIP UND APPARATIVER AUFBAU

Die Gaschromatographie ist ein physikalisches Trennverfahren, bei dem das zu untersuchende Stoffgemisch zwischen zwei nicht mischbaren Phasen getrennt wird. Diese beiden Phasen liegen in verschiedenen Aggregatzuständen vor: die bewegte Phase ist immer gasförmig, die stationäre kann einmal fest sein, dann spricht man von der Gas-Fest-Chromatographie, oder flüssig, dann bezeichnet man das Verfahren als Gas-Flüssig-Chromatographie. Bei der Gas-Fest-Chromatographie beruht die Trennwirkung auf den unterschiedlichen Adsorptionskräften des zu trennenden Stoffgemisches zum festen Stoff der stationären Phase, der oberflächenaktiv ist. Bei der Gas-Flüssig-Chromatographie kommt diese Wirkung durch die unterschiedliche Löslichkeit von Gasen und Dämpfen in der Trennflüssigkeit der stationären Phase zustande. Hierbei handelt es sich aber nicht um einen einmaligen Vorgang, sondern die zu trennenden Stoffe werden mit der mobilen Phase, dem Trägergas, immer wieder fortbewegt, so daß sie sich an einer nächsten Stelle wieder in der stationären Phase lösen können. Da jede Komponente des Stoffgemisches eine ihm eigene Adsorptionskraft, beziehungsweise Löslichkeit, besitzt, ist es einleuchtend, daß verschiedene Stoffe den Weg durch die Säule in verschieden langer Zeit zurücklegen, sie also am Ende der Säule zu unterschiedlichen Zeiten registriert werden können.

Diese am Ende der Trennsäule zu unterschiedlichen Zeiten heraustretenden Substanzen werden von einem Detektor, sei es im einfachsten Falle von einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor, oder im spezielleren von einem Flammenionisationsdetektor oder Elektronen-Einfang-Detektor, angezeigt, an den eine Registriervorrichtung angeschlossen ist. Dieser Schreiber liefert nun das typische Gaschromatogramm in Form von einzelnen Peaks, jeweils Bilder einer Gaußfunktion, das qualitative oder quantitative Aussagen ermöglicht.

Folgende Peaks charakterisieren das typische Gaschromatogramm. Peak L, der Luftpeak, entspricht den Luftanteilen der



Schematisches Chromatogramm

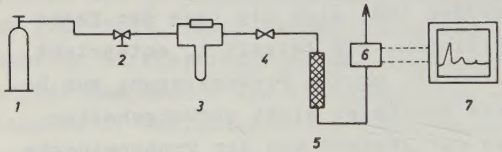
eingegebenen Probe, die mit der gleichen Geschwindigkeit wie das Trägergas, also ohne Verweildauer oder "Retention", die Säule durchwandern. Peak 1 und 2 entsprechen zwei verschiedenen Substanzen, die verschieden lange in der Säule festgehalten wurden, also unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen.

Durch bestimmte Kenngrößen läßt sich die Lage der Peaks im Chromatogramm charakterisieren. Die Totzeit t_d entspricht der Zeit, die eine Probe braucht, um vom Probeneingang zum Detektor zu gelangen, wenn sie überhaupt nicht zurückgehalten wird. In diesem Fall ist es der Abstand von der Probeneingabe bis zum Luftpeak. Die Gesamtretetionszeit t_{dr} gibt die Zeit an, in der sich die Probe in der stationären und in der Gasphase aufhält. Während die Retentionszeit t_r nur über die Verweildauer der Probe in der stationären Phase aussagt. Diese Retentionszeit ist nun bei konstanten Versuchsbedingungen eine für jede Substanz charakteristische Größe.

Die Form der Peaks ist, abgesehen von der Geschwindigkeit des Papiervorschubs am Schreiber, von der Verweildauer der Substanz in der Säule abhängig. Kurze Retentionszeiten ergeben scharfe Peaks, während mit zunehmender Retentionszeit die Basis der einzelnen Peaks immer breiter wird. Dies ist ein Tatbestand, der quantitative Messungen von Substanzen mit langen Retentionszeiten sehr erschwert oder sogar unmöglich macht.

Da bei der Gaschromatographie als mobile Phase immer ein Gas fungiert, liegt es auf der Hand, daß nicht beliebige Stoffgemische zur Auftrennung verwendet werden können. Besonders geeignet sind natürlich gasförmige Substanzen. Aber auch flüssige, gelöste oder feste Substanzen kann man verarbeiten, soweit sie sich unzersetzt und rückstandsfrei verdampfen oder aber zu stabilen Endprodukten zersetzen lassen, ein Vorgang, der als Pyrolyse bezeichnet wird. Doch auch unverdampfbare Stoffe lassen sich trennen, wenn sie zuvor reproduzierbar in verdampfbare Derivate überführt werden.

Folgende Zeichnung soll schematisch den Aufbau einer gaschromatischen Apparatur aufzeigen:



Schematische Darstellung einer gaschromatographischen Apparatur nach BOBER

Das Trägergas strömt aus der Trägergasflasche (1) über ein Regelventil (2) zu einem Strömungsmesser (3). Über die Probenaufgabestelle (4) gelangt es in die Trennsäule (5) und von da in den Detektor (6), der an eine Registriervorrichtung (7) angeschlossen ist.

Trennsäule

Ort der gaschromatographischen Trennung ist eine U-förmige oder spiralig angeordnete, aus Metall oder Glas hergestellte Säule. Im allgemeinen arbeitet man mit einer Metallsäule, jedoch wird auch häufig, wenn eine Alteration der aufgegebenen Probe durch das Metall befürchtet wird, eine Glassäule verwendet. Anfangs wurden standardmäßig Säulen mit einem Durchmesser von

8 - 10 mm benutzt. Doch schon JAMES u. MARTIN (1956) wiesen darauf hin, daß Säulen mit geringerem Durchmesser eine höhere Trennleistung zeigen, so daß man im allgemeinen mit Säulen, die einen inneren Durchmesser von 1,6 mm aufweisen, arbeitet. Doch scheinen heute für analytische Arbeiten Innendurchmesser von 2 - 4,5 mm und Längen von 0,5 - 2 m bevorzugt zu werden; nur für Gasanalysen werden Säulen mit einer Länge bis zu 12 m benutzt. Für präparative Arbeiten sind Röhren mit Innendurchmessern von 0,8 - 10 cm und mit Längen von 5 - 20 m günstiger (JENTZSCH).

Säulenfüllung

Wesentlich für die Trennleistung einer Säule ist ihre Füllung.

Bei der Gas-Fest-Chromatographie werden als stationäre Phase oberflächenaktive Stoffe verarbeitet. Sie eignen sich zur Trennung von Gasen und Kohlenwasserstoffen. Gebräuchliche Substanzen sind: Aktivkohle, Molekularsiebe, Kieselgel und Porapak. Porapak ist eine Substanz, die aus porösen Polymer-Kugeln besteht und besonders gut relativ niedrig siedende polare Verbindungen trennt, so daß auch Wasser, Alkohole, Glykole, Amine oder Säuren mit Hilfe der Gas-Fest-Chromatographie getrennt werden können.

Bei der Gas-Flüssig-Chromatographie ist die Flüssigkeit auf einem möglichst inerten Trägermaterial fein verteilt. Als Trägermaterial dienen heute meist Diatomeenerden, sind sie kalziniert, bezeichnet man sie als Firebrick oder Celite. Obwohl diese Trägermaterialien relativ inert sind, macht sich doch besonders bei der Trennung polarer Substanzen eine geringe noch vorhandene Eigenadsorptionskraft des Trägermaterials durch unsymmetrische Peaks bemerkbar; es kommt zum sogenannten tailing.

Durch spezielle Behandlung des Trägermaterials läßt sich diese Eigenaktivität senken. Ein Waschen mit Salzsäure ent-

fernt anorganische Bestandteile. Durch Silanisierung mit Dimethylchlorsilan oder Hexamethyldisilazan werden oberflächliche Silanol-Gruppen in Silyläther umgewandelt. Sollen basische Substanzen getrennt werden, empfiehlt sich eine Behandlung mit Kaliumhydroxid. Das inerte Trägermaterial wird dann mit der Trennflüssigkeit, wie Phthalsäureester, Sebacinsäureester, Siliconöl oder Polyäthylenglykol, beschichtet.

Die Korngröße des Trägermaterials wird in der sogenannten "mesh"-Zahl angegeben.

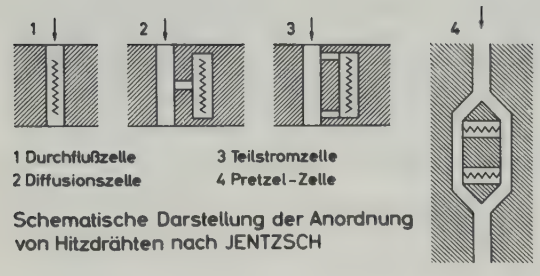
Optimales Auflösungsvermögen zeigen Kapillarsäulen, die "Golay-Säulen". Sie sind nicht wie die üblichen Trennsäulen mit Trägermaterial gepackt, sondern die Trennflüssigkeit wird auf die Innenwand der Kapillare aufgebracht.

Detektoren

Um die aus der Trennsäule heraustretenden Fraktionen sichtbar zu machen, wird ein Detektor der Säule angeschlossen, der die Fraktionen anzeigt.

Mit dem W ä r m e l e i t f ä h i g k e i t s detektor, kurz WLD genannt, wird die Wärmeleitfähigkeit des reinen Trägergases mit der des Trägergases und der beigefügten Fraktion verglichen. Da beim WLD meist Gase mit hoher Wärmeleitfähigkeit, wie Wasserstoff oder Helium, als Trägergas angewendet werden, kommt es beim Auftreten anderer Substanzen im Trägergas zu einer Änderung der Wärmeleitfähigkeit. Wird das Meßelement einige Zeit mit reinem Trägergas umspült, bildet sich ein Temperaturgleichgewicht aus. Das Element hat eine bestimmte Temperatur und damit einen bestimmten Widerstand. Beim Hinzutreten neuer Substanzen ändert sich die Wärmeleitfähigkeit und damit die vom Draht abgegebene Wärmemenge. Dieser Vorgang hat eine Temperaturänderung des Drahtes zur Folge, die eine Änderung des elektrischen Widerstandes hervorruft. Gemessen werden diese Wärmeleitfähigkeitsänderungen mit Thermosistoren oder Hitzdraht-

elementen. Dabei sollten Thermosistoren möglichst nur bei Temperaturen unter 50°C angewendet werden.



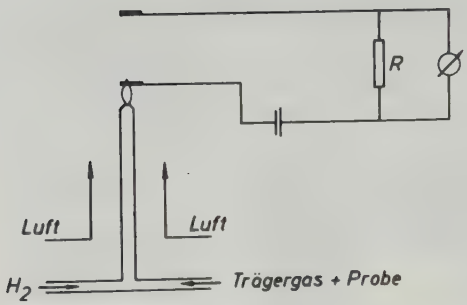
Schematische Darstellung der Anordnung von Hitzdrähten nach JENTZSCH

Die Meßelemente können in verschiedener Art im Gasstrom angeordnet sein. Die Durchflußzelle zeigt zwar eine große Empfindlichkeit, ist aber stark von Strömungsschwankungen abhängig. Diese Schwierigkeit wird durch die Diffusionszelle weitgehend umgangen, dafür ist sie aber weitaus weniger empfindlich und weist eine hohe Zeitkonstante auf. Einen Kompromiß zwischen beiden genannten Zellen stellen die Teilstromzelle und die Pretzel-Zelle dar.

Die eigentliche Messung erfolgt, da keine absoluten Wärmeleitfähigkeiten sondern Wärmeleitfähigkeitsänderungen erfaßt werden sollen, mit Hilfe der Wheatstone'schen Brückenschaltung.

Die Nachweisgrenze des WLD beträgt $12 \cdot 10^{-6}$ bis $4 \cdot 10^{-6}$ mg Substanz / ml Trägergas. Für den Nachweis geringerer Konzentrationen stehen andere Detektoren zur Verfügung.

Dem F l a m m e n i o n i s a t i o n s detektor liegt die Ionisation der aus der Trennsäule heraustretenden Komponenten in einer Wasserstofflamme zugrunde. Nachdem das Trägergas die Säule durchströmt hat, wird ihm eine bestimmte



Schematische Darstellung des FID nach BOBER

Menge Wasserstoff beigefügt, so daß der Düse ein brennbares Gasgemisch entströmt. Durch hinzugeführte Luft kommt es zur Wasserstoffverbrennung. An die Flammendüse und an eine über der Düse angeordneten Auffangelektrode wird eine Spannung gelegt. Die bestehende Ionisation bewirkt, daß über den Widerstand R ein Strom fließt, der an dem Widerstand einen Spannungsabfall hervorruft. Das Signal für diesen Spannungsabfall wird im Schreiber registriert.

Im Gegensatz zum Wärmeleitfähigkeitsdetektor besitzt der Flammenionisationsdetektor, auch FID genannt, eine hohe Spezifität. Er zeigt nur Substanzen an, die noch mindestens eine C-H - Bindung enthalten. Man macht sich diese Tatsache bei der Bestimmung organischer Substanzen in wässerigen Lösungen zu Nutze, da Wasser, dessen Peak vielleicht andere wichtige Peaks überlagern könnte, kaum angezeigt wird.

Wie schon gesagt, liegt die Nachweisgrenze des FID weit günstiger, nämlich bei $1 \cdot 10^{-11}$g Kohlenstoff/sec. Das entspricht einer Stoffkonzentration von 0,1 ppm. Die Nachweisgrenze beim WLD lag bei 10 - 50 ppm.

Der E l e k t r o n e n - E i n f a n g - Detektor (Electron-Capture-Detector, ECD) arbeitet wie der FID mit Hilfe der Ionisation, die aber im Gegensatz zum FID ihren Ursprung im allgemeinen in einer radioaktiven Substanz hat. Der Elektronenstrom kann aber, zum Beispiel, auch durch Photoionisation erzeugt werden, wie BOBER (1968) beschreibt.

Aus der ß-Strahlung einer radioaktiven Substanz entstehen durch Wechselwirkung mit den Trägergasmolekülen (N_2) positive und negative Ladungsträger. Zwischen den Elektroden liegt ein elektrisches Feld, in dem man einen bestimmten Nullstrom messen kann. Ist nun dem Trägergas eine Substanz mit Elektronen-Einfang-Eigenschaften beigegeben, werden durch das Einfangen von Elektronen negative Ionen gebildet. Zwischen den neugebildeten negativen Ionen und den vorhandenen positiven Ionen kommt es zu einer Rekombination. Dieser Vorgang läuft mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ab als die Rekombination zwischen Elektronen und positiven Ionen. Es verschwinden also durch diesen Vorgang Ladungsträger, und der zuvor vorhandene Nullstrom wird kleiner. Da diese Vorgänge unter verschiedenen Bedingungen ablaufen, der erste Vorgang bei Nullbedingungen, das Sammeln der restlichen Ladungsträger an den Elektroden hingegen bei Bestehen einer Feldspannung, arbeitet ein ECD am besten im sogenannten Pulsbetrieb. Es kann jedoch, wenn auch mit ungünstigeren Resultaten, eine Gleichspannung benutzt werden.

Der ECD gehört zu den selektiven Detektoren, das heißt zu den Detektoren, die bestimmte Stoffklassen mit hoher Empfindlichkeit anzeigen. Hier sind es Substanzen, die eine besonders große Elektronenaffinität aufweisen. Da in diese Gruppe auch Halogene gehören, ist der ECD besonders wichtig für den Spurennachweis von Pesticiden in Pflanzen oder Lebensmitteln, oder, in der rechtsmedizinischen Praxis, in menschlichem Gewebe oder Körperflüssigkeiten. Dabei ist es möglich, noch Mengen im Picogramm-Bereich zu erfassen.

Wie der ECD gehören auch die T h e r m i o n i s c h e n Detektoren zu der Gruppe der selektiven Detektoren. Wegen ihrer hohen Empfindlichkeit, großen Spezifität und der Tatsache, daß sie ohne radioaktive Substanz arbeiten, gewinnen sie für die Pesticid-Analysen immer mehr an Interesse. Nachteile der thermionischen Detektoren liegen vorläufig in der beschränkten Konstanz der Empfindlichkeit und der begrenzten Linearität.

Jedoch sind die Arbeiten über diese Art von Detektoren noch nicht abgeschlossen.

GIUFFRIDA berichtet 1964 über die Entwicklung eines Detektors, der spezifisch Phosphor und Halogene anzeigt. Er ist unter der Bezeichnung thermionischer Phosphor-Detektor (TPD) bekannt geworden. Die Autorin geht von einem normalen FID aus, bei dem über der Flamme ein gewendelter, mit Natriumsalz belegter Platindraht angeordnet ist. Da jedoch ständig Natriumsalz abdampft, ist die Reproduzierbarkeit der Empfindlichkeit gering.

Die Spezifität des Detektors ist von dem Gasvolumenfluß des Wasserstoffes abhängig, dessen Optimum für phosphorhaltige Verbindungen bei 13 - 17 ml/min liegt. Eine Schwierigkeit besteht darin, daß auch nicht phosphorhaltige Verbindungen bei verschiedenem Gasvolumenfluß angezeigt werden.

Die Nachweisgrenze des Detektors liegt nach Angaben der Firma Varian Aerograph für Pesticide je nach Struktur zwischen 3 - 500 pg (nach JENTZSCH).

JENTZSCH, ZIMMERMANN u. WEHLING berichten 1966, ausgehend von Arbeiten von GIUFFRIDA und KARMEN, über einen Detektor, der Halogen und Phosphor spezifisch anzeigt, den thermionischen Halogen- und Phosphordetektor (HPD). Auch diesem Detektor liegt ein FID zugrunde. Er ist, abweichend vom FID, jedoch mit einer zweiten Flamme versehen. Um die obere Düse ist eine mit Alkali gefüllte Platinkapillare gewickelt, die, wenn sie zum Glühen gebracht wird, eine Alkaliemission bewirkt. FID und HPD sind in Serie geschaltet, so daß die aus der Säule austretenden Substanzen erst mit dem FID erfaßt werden. Dabei wird die ursprüngliche Struktur der Substanz zerstört und nur die Halogen- und Phosphorverbindungen gelangen zur zweiten Flamme.

Trägergas

Die Wahl des Trägergases hängt von der Art des benutzten Detektors ab.

Für die Arbeit mit dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor wird als Trägergas ein Gas mit hoher Wärmeleitfähigkeit benötigt. Diese Voraussetzungen erfüllen Wasserstoff und Helium. Helium sollte dabei wegen seiner Ungefährlichkeit der Vorzug gegeben werden.

Für den Flammenionisationsdetektor können alle anorganischen Gase außer Sauerstoff verwendet werden. Am gebräuchlichsten ist Stickstoff. Im Gegensatz zum WLD benötigt der FID aber noch zwei weitere Gase, nämlich Wasserstoff und Luft, um das Brennen der Flamme zu gewährleisten.

Der Elektronen-Einfang-Detektor kann mit verschiedenen Gasen betrieben werden. Bei Gleichspannungsbetrieb kann man mit Stickstoff, bei Pulsbetrieb mit Argon unter Zusatz von 5% Methan arbeiten.

Arbeitstemperatur

Von großer Bedeutung für die Trennung auf der Säule ist die vorgegebene Temperatur. Sie sollte so gewählt sein, daß sich die aufgegebene Probe in der Dampfphase befindet. Dabei kann die Temperatur 50 - 100°C unter dem Siedepunkt der betreffenden Substanz liegen, Voraussetzung ist nur, daß der Dampfdruck der Probe bei dieser Temperatur hoch genug ist, um die, meist ja geringe, Probenmenge zu verdampfen. Dies trifft besonders für das Arbeiten mit dem FID zu, bei dem man ja sehr geringe Menge vorliegen hat. Voraussetzung für eine spätere Auswertung des Gaschromatogramms ist eine gleichbleibende Temperatur. Durch eingebaute Thermostaten wird sie konstant gehalten. Abgesehen von dieser Arbeitsweise bei konstanter Temperatur, der isothermen Gaschromatographie, ist auch eine Gaschromatographie mit Temperaturprogrammierung

möglich. Dabei sollte die Starttemperatur so gewählt sein, daß sie nicht mehr als 20°C über dem Siedepunkt der am niedrigsten siedenden Probenkomponente liegt.

3. AUSWERTUNGSMETHODEN

Methoden zur qualitativen Bestimmung

Um eine Probe zu identifizieren, kann man die Vergleichsmethode benutzen. Dabei gibt man unter gleichen Bedingungen die Probe und eine Testsubstanz ein und vergleicht die Lage der Peaks.

Außerdem ist eine Identifizierung mit Hilfe gaschromatographischer Spektren möglich. Dazu wird die zu bestimmende Substanz über 4 parallel geschaltete Säulen geschickt, deren stationäre Phase verschiedene Polarität aufweisen. Es hat sich gezeigt, daß es kaum Substanzen gibt, deren chromatographische Spektren identisch sind.

Die Fraktionen können jedoch auch am Ausgang des Gaschromatographen aufgefangen und durch andere physikalische Methoden identifiziert werden. Als Methoden kommen dabei die Dünnschichtchromatographie, die IR-Spektroskopie und die Massenspektroskopie in Frage.

Methoden zur quantitativen Bestimmung

Das Integral eines Peaks ist ein Maß für die Konzentration der auszuwertenden Komponente. Deshalb muß bei der quantitativen Auswertung eines Chromatogramms die Integration der einzelnen Peaks durchgeführt werden. Nur in einzelnen Fällen, wenn wirklich ganz symmetrische Peaks vorliegen, kann man die Peakhöhe als Maß der Konzentration heranziehen. Im allgemeinen muß jedoch der Flächenwert bestimmt werden. Das kann geschehen, indem man die zu bestimmende Fläche aus-

schneidet und anschließend wägt. Der Flächenwert kann jedoch auch aus der Peakhöhe und der Gesamtretentionszeit oder der Halbwertsbreite bestimmt werden. Die zuverlässigsten Werte erhält man mit elektronischen Integratoren.

Wesentlich genauer läßt sich die quantitative Auswertung von Gaschromatogrammen durch die Verwendung elektronischer Rechenanlagen im on-line-Betrieb ausführen. Es handelt sich dabei um einen direkten Anschluß des Gaschromatographen an den Rechner (GOLD u. METZGER 1969). So ist zum Beispiel nur auf diesem Wege eine zuverlässige Bestimmung von sich überlappenden Peaks möglich.

II. DIE GASCHROMATOGRAPHIE IN DER RECHTSMEDIZIN

1. BEDEUTUNG DER GASCHROMATOGRAPHIE FÜR DIE RECHTSMEDIZIN

Nachdem die Gaschromatographie seit dem Anfang der fünfziger Jahre als analytisches Verfahren eine solch starke Verbreitung erfahren hatte, lag es auf der Hand, diese Methode auch in der rechtsmedizinischen Praxis einzusetzen.

Die hohe Empfindlichkeit der verschiedenen Detektoren, zusammen mit der Möglichkeit, Extrakte aus biologischem Material direkt bestimmen zu können, ohne sie vorher noch Reinigungsprozessen unterwerfen zu müssen, kam den Wünschen des Rechtsmediziners sehr entgegen, der ja häufig nur Spuren einer Substanz vorliegen hat. Anreicherungsverfahren sind nicht möglich, wenn es sich zum Beispiel um die Identifizierung eines versehentlich oder in suizidaler Absicht getrunkenen Lösungsmittels handelt. Die Reinigung eines Organextraktes wird immer mit einem Substanzverlust einhergehen, der bei dem ohnehin nur in Spuren vorliegenden Material entscheidend sein kann.

Ein weiterer Vorzug der Gaschromatographie gegenüber den herkömmlichen Verfahren, zum Beispiel der Dünnschichtchromatographie bei Schlafmittelnachweisen, ist die Möglichkeit der qualitativen und quantitativen Bestimmung in einem Arbeitsgang. Die Aufarbeitung der Magenspülflüssigkeit nach Stas-Otto oder Curry ist dabei die gleiche. Während bei der herkömmlichen Methode der Dünnschichtchromatographie zunächst nur eine qualitative Bestimmung möglich ist, an die sich in einem zweiten Arbeitsgang die quantitative anschließen muß, ermöglicht die Gaschromatographie beide Bestimmungen durch eine einzige Einspritzung, da der vom Schreiber gelieferte Peak durch seine Retentionszeit eine qualitative und durch seine Fläche eine quantitative Aussage erlaubt.

Es liegt auf der Hand, daß die Gaschromatographie, bei der nur ein Arbeitsgang ausgeführt wird, mit einem geringeren Fehler belastet ist und weniger Zeit beansprucht.

Aber nicht nur das Einsparen eines Arbeitsganges bedingt die kurze Analysenzeit. Die Gaschromatographie als solche ist ein schnell arbeitendes Analysenverfahren. Es bleibt immer, je nach Stoffklasse verschieden, im Minutenbereich. Die anderen Chromatographiemethoden hingegen weisen Laufzeiten von Stunden auf: die Dünnschichtchromatographie ungefähr 1/2 - 3/4 Stunde, die Papierchromatographie bis zu 12 Stunden und die Säulenchromatographie noch länger.

Eine Lücke in der Reihe der Analysenverfahren schloß die Gaschromatographie im Bereich der Nachweismöglichkeiten von flüchtigen Substanzen. So ist die Gaschromatographie in der Kriminalistik zur Methode der Wahl geworden, weil man z.B. durch ihren Einsatz in der Lage ist, flüchtige Brandlegungsmittel aus Brandschutt zu bestimmen.

2. ZUSAMMENSTELLUNG DER LITERATURÜBERSICHT

Schwierigkeiten ergaben sich bei der Zusammenstellung der Literaturübersicht. Sie sollte alle Arbeiten enthalten, die sich mit gaschromatographischen Arbeitsmethoden beschäftigen, die von speziell rechtsmedizinischem Interesse sind. Dabei waren die Grenzen zwischen Rechtsmedizin und Pharmakologie beziehungsweise Pharmazie, so bei Arbeiten über Barbituratnachweise, oder zwischen Rechtsmedizin und der Agronomie, deutlich bei den Arbeiten über Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln, schwer zu ziehen. Völlig fließende Übergänge fanden wir zur klinischen Chemie. Wir waren also darauf angewiesen, hier nach eigenem Ermessen abzugrenzen. Diese Tatsache bedingt aber, daß es sich doch nur um eine Auswahl handeln kann.

Grundlage der Literaturübersicht waren die "Chemical Abstracts" unter "chromatography: gas". Unter diesem Stichwort waren aber nicht alle aufgeführten Arbeiten zu erfassen, so daß wir die Literaturübersicht aus den jeweils schon bekannten Arbeiten weiter aufbauen mußten.

3. LITERATURÜBERSICHT

Rechtsmedizin (allgemein)

Die erste Arbeit, die auf die allgemeine Bedeutung der Gaschromatographie in der Gerichtsmedizin hinweist, erscheint 1958 von WEINIG u. LAUTENBACH (16). Anhand von Analysenbeispielen umreißen die Autoren die Möglichkeiten, die sich durch den Einsatz der Gaschromatographie im Rechtsmedizinischen Labor erschließen: die Identifizierung zweier Benzinproben, Nachweise von chlorierten Kohlenwasserstoffen im Blut, Fuselöle in Getränken, flüchtige Gifte im Harn und flüssige Brandlegungsmittel. Besondere Bedeutung wird dem Nachweis von Fäulnisalkoholen im Blut beigemessen, die mit Hilfe einer extraktiven Destillation freigesetzt und dann gaschromatographisch bestimmt werden. Zur Aufklärung der postmortalen Bildung von Alkoholen war diese Methode gut geeignet. Um jedoch als Routinemethode zur Bestimmung von Äthanolgehalten im Blut ausgearbeitet zu werden, war der benötigte Zeitaufwand zu groß.

1960 folgt eine Arbeit von MARICQ u. MOLLE (14) über die Anwendungsmöglichkeiten der Gaschromatographie in der Toxikologie. Im gleichen Jahr weisen CADMAN u. JOHNS (7) auf die Einsatzmöglichkeiten im kriminalistischen Labor hin. Nach vorheriger Extraktion weisen sie Alkohol im Blut nach, bestimmen Alkohol in der Atemluft, Gase im Blut und weisen toxische Substanzen wie Schwefelwasserstoff, Cyclopropan, Kohlenmonoxid, Schwefelkohlenstoff und Ethchlorvynol nach. Außerdem wird der Einsatz der Gaschromatographie bei Brandstiftungsfällen beschrieben. Diese Arbeit erfährt 1963 eine Ergänzung durch die Veröffentlichung von CADMAN (6), die eine umfassende Beschreibung der gaschromatographischen Methode und genaue Angaben der Versuchsbedingungen bei den einzelnen Stoffklassen enthält. Außerdem wird erstmals über die Nachweismöglichkeiten fester Stoffe, zum Beispiel Barbiturate und Alkaloide, berichtet. Einen Überblick nach einem neueren Stand der Entwicklung bringen die Arbeiten von MACHATA (12, 13) aus dem Jahren 1965 und 1966

und BRANDENBERGER (4).

Über den Einsatz der Gaschromatographie bei der Begutachtung 6 gerichtsmedizinischer Fälle berichten NANIKAWA u. KOTOKU (15). Sie analysieren Äther in Watte, Bromural in Erbrochenem, E 605 in Magenspülflüssigkeit, Procain in der Injektionsstelle, Doriden in unbekanntem Pulver und Endrin in Magenspülflüssigkeit. Dabei reichten 1 - 5 ug der nachzuweisenden Substanz zur qualitativen Analyse.

DERGE (8) beschäftigt sich in seiner Arbeit mit dem Einsatz der Gaschromatographie in der Medizin. Die Arbeit ist durchaus von rechtsmedizinischem Interesse. Gasanalysen von Atemluft und Anästhesiegasen werden durchgeführt, Alkohol im Blut wird mit Hilfe einer Doppelsäulenanordnung, die ein direktes Einspritzen des Materials ermöglicht, nachgewiesen und Trennungen von Drogen und Arzneimitteln vorgenommen.

Schwierigkeiten können bei der Bestimmung größerer Substratmengen auftreten. BRAHM-VOGELSANGER u. WAGNER (3) beschreiben eine Methode, bei der das biologische Material in einem geschlossenen System vorverdampft wird und dann sofort über ein Gasprobeneinlaßventil auf die Säule gelangt. Als Vorteile der Methode werden angeführt: 1. Möglichkeit der Überprüfung des Materials ohne vorherige Aufarbeitung und Fremdzusatz, 2. Kein Verschmutzen des Einspritzblocks und 3. Erhöhung der Genauigkeit und Empfindlichkeit durch genaues Abwiegen und Einbringen größerer Substratmengen als sonst üblich.

DE ZORZI (9) zeigt in seiner Arbeit die Einsatzmöglichkeit der Gaschromatographie neben der IR-Spektroskopie. Über die Anwendung der Zweikolonnentechnik in der Gaschromatographie berichtet BOBER (1, 2). Neben verschiedenen Gasanalysen, zum Beispiel Atem- und Narkosegasbestimmung, werden Trennungen von C_5 - C_7 Paraffinen und -Aromaten und Analysen von Alkohol-Wasser-Gemischen beschrieben.

Einen auch für rechtsmedizinische Belange sehr umfassenden Abriß geben BURCHFIELD u. STORRS (5), GOLDBAUM et al. (11), GADAMER (10), GUDZINOWICZ (11a) und SZYMANSKI (15a).

Blutalkohol

Gegenüber den herkömmlichen Verfahren der Blutalkoholbestimmung, die Widmark- und die ADH-Methode, bietet die gaschromatographische Bestimmung den Vorteil, daß sie neben dem Äthylalkohol auch höhere und niedrigere Alkohole, wie zum Beispiel die Fäulnisalkohole, und andere flüchtige Substanzen wie Aceton, die einen höheren Äthanolgehalt vortäuschen können, erfaßt und trennt. Durch die Entwicklung einer automatischen Bestimmungsmöglichkeit (38) ist sie besonders geeignet, als Routineverfahren eingesetzt zu werden.

Früh nach dem allgemeinen Bekanntwerden der gaschromatographischen Methode befaßte man sich mit ihrer Anwendbarkeit für die Blutalkoholbestimmung. WOLTHERS (54) veröffentlicht schon 1956 eine Arbeit, in der er über die Möglichkeit der direkten Bluteinspritzung in die chromatographische Säule berichtet. Er führt die Experimente mit einem selbst konstruierten Apparat durch.

Im Laufe der Jahre zeichnen sich bei der Bewältigung des Problems, daß Blut wegen des hohen Anteils an Festbestandteilen auf der Säule, und weil es eine wäßrige Lösung ist, also kaum zum einfachen Einspritzen in die gaschromatographische Säule geeignet ist, mehrere Wege ab.

MARICQ u. MOLLE (39), MATUMOTO (41) und DURITZ u. TRUITT (24) fällen vor der gaschromatographischen Bestimmung die Eiweißbestandteile mit chemischen Agenzien. Die Proben sind so zwar leicht dosierbar, aber die Art der Blutaufbereitung bringt doch eine große zusätzliche Fehlerquelle mit sich. Dieselben Einwände lassen sich für eine Destillation, wie sie

FOX (25) und MC CORD u. GADSEN (35) durchführen, anbringen.

Die Kombination der Essigsäureesterextraktion mit der Gaschromatographie zum Zwecke der Alkoholisolierung beschreiben zuerst DIETZE (20) und CADMAN u. JOHNS (7). Prinzipiell in gleicher Weise gehen JANITZKI (30), OSTERHAUS u. JOHANNSMEIER (43) und STEINBERG et al. (51) vor. DAVIS (19) verwendet statt des Essigsäureesters Dioxan. Wichtige neue analytische Aspekte bringen SKRABANEK u. NOVAK (50) in ihrer Arbeit, indem sie ein Schema für die Rückspülung des Extraktionsmittels vorschlagen. Die Dauer einer Analyse kann dadurch auf 5 Minuten verkürzt werden, während sich die Analyse ohne diesen Vorgang über einen Zeitraum von einer Stunde erstreckt.

Alle bisher erwähnten Methoden enthalten durch die Notwendigkeit der Blutaufbereitung aber doch große Fehlerquellen und bergen die Gefahr des Einschleppens weiterer flüchtiger Stoffe durch das Extraktionsmittel in sich, so daß sie sicherlich einer Methode, bei der Blut direkt ohne vorherige Aufbereitung in die chromatographische Säule gebracht wird, unterlegen sind.

Frühe Arbeiten, in denen direkte Einspritzmethoden beschrieben werden, stammen von PARKER et al. (44) und LASKARIS et al. (33). CHUNDELA u. JANAK (18) benutzen bereits, wie später von BOBER (17) beschrieben, eine Anordnung von 2 Kolonnen mit einem auswechselbaren Einsatz am Einspritzblock, um die Verunreinigungen, die das organische Material verursachen, beseitigen zu können.

Aus derselben Zeit stammen die Arbeiten von DRAWERT u. Mitarbeitern (21, 22, 23), die die Bestimmungen von Blutalkoholen mit Hilfe der Reaktions-Gaschromatographie beschreiben. Es handelt sich dabei um die Untersuchung von Reaktionen, die in einem der analytischen Säule vorgeschalteten Reaktionsraum ablaufen. Die dort entstehenden Reaktionsprodukte bleiben im geschlossenen System des Gaschromatographen und werden vom

Trägergasstrom auf die analytische Trennsäule mitgenommen. Das Wasser wird mit Kalziumhydrid in einem anderen Reaktor zu Wasserstoff umgesetzt und dadurch eliminiert. Der Blutalkohol selbst wird als Ester der salpetrigen Säure oder als Olefin bestimmt. NATELSON u. STELLATE (42) lösen das Problem der Wasserelimination, indem sie die wäßrige Lösung im geschlossenen System mit Kupfersulfat reagieren lassen.

Zum routinemäßigen Gebrauch im rechtsmedizinischen Labor haben sich jedoch nur wenige Methoden durchsetzen können.

Die Methode der gaschromatographischen Dampfraumanalyse, oder "head-space" Methode, wird erstmals von CURRY et al.(56) und GOLDBAUM et al. (11) als Verfahren zur Analyse von Blutalkoholgehalten verwendet. Sie beruht auf der Tatsache, daß der Partialdruck des Dampfes über der Lösung entsprechend dem Henry-Dalton'schen Gesetz der Konzentration dieses Stoffes in der Lösung proportional ist. Bei Spurenanalysen können zur Erhöhung des Dampfdruckes Salze zugegeben werden, wie es von CURRY et al. (56), MACHATA (37) und WALLACE u. DAHL (53) angegeben wird.

Die Ausarbeitung dieser Methode zum Routineverfahren, das automatisiert werden kann, lag vornehmlich in den Händen von MACHATA (36, 37, 38). Die Blutproben werden mit tertiärem Butylalkohol als innerem Standard versehen und dann auf einer mit Polyäthylenglykol 1500 oder 1540, Hallcomid 18 oder Porapak gepackten Säule getrennt und von einem FID erfaßt. Die Auswertung erfolgt nach der Quotientenmethode H-Alkohol / H-tert. Butanol, der eine Ausmessung der Peakhöhen zugrunde liegt. Zur Bestimmung zahlreicher Proben wurde vom Bodenseewerk Perkin-Elmer, Überlingen, in Zusammenarbeit mit MACHATA der automatische, analytische Gaschromatograph "Multifract F 40" entwickelt, der maximal 30 Proben dosieren kann. Für jede Probe kann eine Doppelbestimmung ausgeführt werden. Bei einer normalen Analysendauer von 4 Minuten werden alle flüchtigen Substanzen erfaßt und quantitativ ermittelt. Sollen bei der Prüfung

auch Fäulnisalkohole erfaßt werden, erhöht sich die Analysenzeit auf 8 Minuten. Bei einem Test von 30 Proben wird eine Standardabweichung von 0,63 % angegeben.

Die Methode der Zweikolonnentechnik, die BOBER (17, 1, 2) in seinen Arbeiten beschreibt, ermöglicht die Durchführung der Blutalkoholanalyse mit einer normalen Wärmeleitfähigkeitszelle als Detektor. Ausgeführt werden diese Arbeiten auf einem Beckman-Gerät. Als Voraussetzung für die Arbeitsmethode muß eine Vorkolonne verwendet werden, die eine besonders lange Retentionszeit für Wasser hat. Eine mit 30% Glycerin auf silanisiertem Chromosorb W gefüllte Säule erfüllt diese Voraussetzung. Die eigentliche analytische Säule, die alle in Frage kommenden Substanzen vom Äthanol abtrennt, enthält 8% Dioctylsebacinat + 2% Behensäure + 10% Nonylphenol auf Chromosorb W. Auf ihr wird der Äthylalkohol getrennt und bestimmt. Nachdem die zu bestimmenden Substanzen von der Säule eluiert sind, wird das auf der Vorkolonne zurückgehaltene Wasser ausgespült. Geschaltet werden die Kolonnen über ein Dreiwegventil. Um eine Verschmutzung der Injektionsstelle und der Kolonne zu verhindern, ist der Gaschromatograph mit einem auswechselbaren Siebeinsatz ausgerüstet, der die Festbestandteile des Blutes zurückhält. Als Analysendauer wird eine Zeit von ungefähr 10 Minuten angegeben. Der mittlere relative Fehler beträgt 3,1.

Ebenfalls auf einem Beckman-Gerät durchgeführt sind die Versuche von SCHLUNEGGER (45 - 49), der die Blutalkoholgehalte auf einer Säule mit einem Gemisch von 78 Teilen NPGA (Nonylphenol-Glycerin-Äther), 22 Teilen ORGA (Isooctyl-Resorcin-Glycerin-Äther) und 2 Teilen Alkaterge T in einer Belegungsdichte von 10 % auf Chromosorb A-NAW bestimmt. Seine Arbeitsweise erlaubt eine Doppelbestimmung innerhalb einer Viertelstunde, die, bei einem Alkoholgehalt von 0,8‰, einen Standardfehler von $\pm$ 2% aufweist.

Gase in Blut und Alveolarluft

Die Ermittlung von Äther- oder sonstigen Anaesthetika-Konzentrationen im Blut kann von forensischer Bedeutung sein, wenn es um die Bestimmung eines Narkosestadiums bei operativen Zwischenfällen oder um die Feststellung, ob eine Bewußtlosigkeit bei kriminellen Delikten durch Anaesthetikadämpfe hervorgerufen wurde, geht. Kommt der Äther allein vor, läßt er sich nach der Widmark-Methode feststellen. Sind jedoch gleichzeitig andere flüchtige Substanzen, besonders häufig liegen zusätzlich Alkohol und Aceton vor, vorhanden, versagt die Methode. Das einzige spezifische Verfahren ist dann die gaschromatographische Bestimmung. Wie auch bei der Blutalkoholbestimmung sind verschiedene Methoden zur Substanzisolierung ausgearbeitet worden.

CURRY et al. (56) weisen flüchtige Gifte wie Äther, Halothan, Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff nach der "headspace" Methode nach. Ebenso geht MACHATA (60) vor, der Äther auf einer Porapak Q - Säule unter Zusatz von tert.-Butanol als innerem Standard bestimmt. HILL u. BUTLER (59) extrahieren die Anaesthetika mit n-Heptan aus dem Blut, während NORTHINGTON u. OWENS (65) den in der Probe enthaltenen Äther mit Cyclohexan-Kalziumchlorid aussalzen. Ein anreicherndes Destillationsverfahren mit Toluol wenden GADSEN u. MC CORD (57) zur Isolierung der Anaesthetika an. MERLI u. DE ZORZI (63) evaporieren die Proben in einer vorgeschalteten Kammer, von der die zu bestimmende Probe direkt auf die Trennsäule gelangt. Für die Einschränkung und Anwendbarkeit der verschiedenen Methoden läßt sich das über die Blutalkoholbestimmung Gesagte wiederholen.

Mit einem Fractometer F 7, der mit einem FID ausgerüstet ist, führt MACHATA (61) auf einer Silicagel-Säule Differenzierungen der Kohlenoxidvergiftungen durch. Als Untersuchungsmaterial dient Alveolarluft. Bei verschiedenen CO-Quellen läßt sich ein charakteristischer Befund erheben, der es erlaubt, Rückschlüsse auf die Ursache der Vergiftung zu ziehen. So kann

man bei einer Leuchtgasintoxikation einen wesentlich höheren Methananteil nachweisen als bei einer Vergiftung mit Abgasen. Auch bei einer Abgasintoxikation ist eine weitere Differenzierung noch möglich. Wurden Leuchtgasabgase eingeatmet, lassen sich neben Methan deutliche Mengen von Acetylen mit einem geringeren Äthylenanteil nachweisen, während bei einer Rauchgasvergiftung höhere Äthylenanteile gefunden werden.

Kohlenoxid im Blut weisen AYRES et al. (55), WILSON (67) und MACHATA (12) nach. Nach MACHATA wird die Blutprobe mit Kaliumferricyanid und Milchsäure in einem geschlossenen System zersetzt und das entstehende Gasgemisch gaschromatographisch analysiert. Das Verfahren ist streng spezifisch und gelingt auch bei faulen Leichenbluten, wo andere Methoden versagen.

Lösungsmittel

In steigendem Maße finden sich heute im modernen Haushalt chemische Reinigungsmittel von erheblicher Toxizität, zum Beispiel Fußbodenreiniger und Fleckenentferner, um nur einige zu nennen. So liegt es auf der Hand, daß der Rechtsmediziner immer häufiger vor der Frage der Identifizierung solcher Lösungsmittel steht, wenn diese versehentlich oder in suizidaler Absicht eingenommen worden sind. Auch für gewerbehygienische Belange ist die Analyse von Lösungsmitteln unentbehrlich. Da sie zu der Gruppe der leichtflüchtigen Substanzen gehören, bietet sich die gaschromatographische Methode zur Bestimmung an.

Die schon früh entstandenen Arbeiten beschäftigen sich nur mit dem Reinsubstanznachweis. So gibt KOVATS (72) schon 1958 Retentionszeiten für einige Lösungsmittel an. BOLTZ et al. (68) setzen bei einer Äthylenglykolvergiftung die Gaschromatographie zur Bestimmung des Prozentgehaltes der Wirksubstanz in der getrunkenen Flüssigkeit ein. MACHATA (74) gelingt es, die Hauptbestandteile eines eingenommenen Terpentin-

öls zu identifizieren und damit die Herkunft des Mittels durch den Vergleich der Zusammensetzung zu ermitteln.

HAUCK (71) ermittelt nach der "head-space" Methode 23 Substanzen, die in Lösungsmitteln vorkommen und gibt relative Retentionszeiten an. Eine Erweiterung erfährt diese Arbeit durch die Veröffentlichung von WEYRICH et al. (79), in der 48 Lösungsmittel mit relativen Retentionszeiten, bezogen auf Trichloräthylen, angegeben werden. Die Autoren beschreiben die Nachweismöglichkeiten dieser Lösungsmittel aus Magenspülflüssigkeit oder anderem biologischen Material, das ohne vorherige Anreicherung der flüchtigen Substanzen eingespritzt werden kann. CHUNDELA et al. (69) machen Angaben über die Bestimmungsmöglichkeiten chlorierter organischer Stoffe. Diese werden in biologischem Material bestimmt und mit Hilfe eines Zweiflammendetektors (FID und Thermionisationsdetektor TID) identifiziert.

Eine direkte gaschromatographische Methode zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Benzinintoxikationen in Rattenvollblut gibt SCHLUNEGGER (78) an.

Häufig fungieren Lösungsmittel als Brandlegungsmittel. Hier bietet die Gaschromatographie die ideale Bestimmungsmöglichkeit, indem sie durch eine Dampfanalyse den Nachweis flüchtiger Lösungsmittel aus dem Brandschutt ermöglicht. Schon früh wird auf dieses Einsatzgebiet in der Kriminalistik hingewiesen, erstmals 1958 von WEINIG u. LAUTENBACH (16), nachfolgend 1960 von LUCAS (73) und 1962 von PARKER et al. (76). MACHATA (75) gibt neben den Untersuchungen von Brandrückständen die Identifizierungsmöglichkeit von Benzinproben nach der Vergleichsmethode an.

Barbiturate

In der rechtsmedizinischen Praxis kommt es darauf an, exakte und eindeutige Analysen von Schlafmitteln, sei es aus

organischem Material oder als Reinsubstanz, zu machen. Wie schon eingangs angeführt, sind die sonst angewendeten Verfahren mit einem hohen Zeitaufwand verbunden. Deshalb sind Methoden zur gaschromatographischen Bestimmung in organischem Material ausgearbeitet worden. In den vorliegenden Arbeiten handelt es sich zu einem großen Teil um Trennungen von Barbituratgemischen, es wurden aber auch Bestimmungen in organischem Material durchgeführt.

PARKER et al. (100) geben zwei Listen mit Retentionszeiten für 28 Barbiturate bei verschiedenen Arbeitstemperaturen, bei 210°C und 230°C, an. BROCHMANN-HANSSEN u. BAERHEIM-SVENDSEN (85) prüfen in ihrer Arbeit eine Anzahl unterschiedlicher stationärer Phasen auf ihre Anwendbarkeit für die Barbituratbestimmung durch, während COOK et al. (88) und JANITZKI (93) Barbiturate mit Hilfe einer Differenzmethode auf mehreren Säulen identifizieren. Mit dem Problem der tailing-Bildung beschäftigen sich BROCHMANN-HANSSEN u.BAERHEIM-SVENDSEN (86) und CIEPLINSKI (87). Die Autoren suchen sie durch eine Behandlung des Trägermaterials mit sauren Zusätzen zusammen mit Hexamethyldisilazan (87) oder mit Hexamethyldisilazan allein (86) zu verhindern. Während in den bisher zitierten Arbeiten jeweils Barbiturate in Mikrogramm-Mengen vorliegen, beschäftigen sich BRADDOCK u. MAREC (84) und GUDZINOWICZ u. CLARK (89) mit dem Nachweis von Barbituratmengen, die kleiner als 1 Mikrogramm sind. Beide Autoren weisen darauf hin, daß es bei einer Verringerung der Konzentration zu einer Verlängerung der Retentionszeit kommt.

Einen ganz anderen Weg der Analyse beschreiten JANAK (91, 92) und NELSON u. KIRK (97, 98), indem sie die Pyrolysetechnik, die im allgemeinen bei der Untersuchung von Polymeren angewendet wird, einsetzen. Die Autoren untersuchen die Pyrolyseprodukte der Barbiturate und ziehen die bei diesem Vorgang auftretenden charakteristischen Spaltprodukte zur Identifizierung heran.

In den folgenden Arbeiten werden Barbiturate in organischem Material nachgewiesen. BAERHEIM-SVENDSEN u. BROCHMANN-HANSSEN (82) bestimmen Barbiturate im Urin. PARKER u. KIRK (99), sowie KAZYAK u. KNOBLOCK (94), JAIN et al. (90), REITH et al. (101) und MARTIN u. DRISCOLL (96) geben neben der Möglichkeit der Separation und Identifikation von Barbituraten genaue Extraktionsverfahren aus organischem Material an. Die Genauigkeit der quantitativen Aussage, auf die in den eben erwähnten Arbeiten relativ wenig Wert gelegt wird, verbessert ANDERS (80), indem er vor der Bestimmung die Säule mit 10 ul einer 0,1%igen Lösung des erwarteten Barbiturats in Chloroform sättigt.

Über die Kombination der Gaschromatographie und Dünnschichtchromatographie in der Barbituratanalyse berichten BATTISTA u. MACHATA (83). Sie führen qualitative und quantitative Bestimmungen ohne weitere Reinigung des Extraktes durch. In einer weiteren Arbeit geben MACHATA u. BATTISTA (95) nach der Bereitung der Organextrakte nach Stas-Otto oder Curry relative Retentionszeiten für 20 Barbiturate und andere Schlafmittel. Außerdem gelingt ihnen erstmals die vollständige Auftrennung von Phenobarbital und Cyclobarbital.

Alkaloide

Prinzipiell dieselben Schwierigkeiten und daher auch dieselben Arbeitsmethoden ergeben sich bei der gaschromatographischen Bestimmung von Alkaloiden.

Eine Reihe von Autoren führen Reinsubstanznachweise durch und geben Listen mit Retentionszeiten an (103, 105, 107, 109, 110, 113, 118, 119). Eine Differenzierung der Anwendungsmöglichkeiten der Gaschromatographie, Dünnschichtchromatographie und Papierchromatographie bei der Identifizierung von Opiumalkaloiden geben BROCHMANN-HANSSEN u. FURUYA (108). Die Direktanalyse von Alkaloidsalzen bei programmierter Temperatur besprechen BROCHMANN-HANSSEN u. BAERHEIM-SVENDSEN (106). Dabei

wird der katalytische Effekt der Glaswolle am Eingang der Trennsäule auf die thermische Zersetzung der Alkaloide diskutiert. Ebenfalls mit Temperaturprogrammierung arbeiten VESSMAN (122) und VAN BINST et al. (104). Die Trennungsmöglichkeiten mit Kapillarsäulen beschreiben MASSINGILL u. HODGKINS (120). Die Retentionsdaten der 25 untersuchten Alkaloide sind auf Nikotin oder Coffein als innerem Standard bezogen. Die Pyrolysetechnik zur Untersuchung wenden FONTAN et al. (114), GUDZINOWICZ et al. (116) und KONGSTON u. KIRK (117) an.

In biologischem Material, indem sie Organextrakte von Blut, Leber und Urin herstellen, weisen PARKER et al. (121) Pharmaka im Mikrogramm-Bereich nach. Eine Nachweisgrenze von 1 Gamma erreichen CARTONI u. DE STEFANO (111) bei der Bestimmung von Amphetamin in Urin. Als Bestätigungsmethode beim Nachweis von Arzneimitteln in Leichenorganen wenden FALZI et al. (112) die Gaschromatographie an. Sie bestimmen die therapeutischen Dosen der eingenommenen Arzneimittel direkt aus einem Extrakt.

Aus Pflanzen extrahieren FRAUENDORF u. VOGEL (115) Tropanalkaloide, um dann eine gaschromatographische Trennung durchzuführen.

Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel

Eine immer weitere Verbreitung haben die Herbizide und Insektizide in ihrer Anwendung gefunden, so daß ihr Nachweis in der toxikologischen Analyse einen immer größeren Raum einnimmt. Die Schwierigkeiten, die bei ihrer Bestimmung auftreten, sind darin zu suchen, daß jeweils nur Spuren der Substanzen vorliegen und die für andere Bestimmungen ausreichenden Detektoren, wie WLD und FID, nicht empfindlich genug sind. So ist es verständlich, daß eine Vielzahl von Methoden entwickelt wurde.

COULSON et al. (132) weisen 1959 eine Reihe von Insektiziden in einem speziell dafür umgebauten Gaschromatographen bei Temperaturen von 220°C und 280°C nach. Sie benutzen dabei einen WLD, dessen Nachweisgrenze bei 200 Gamma liegt. WEINIG et al. (148) weisen Insektizide der Systoxgruppe anhand von charakteristischen Spaltprodukten nach, die beim Kochen mit Säure, Lauge oder Natriumalkoholat entstehen. Auch hier liegt die Nachweisgrenze bei 250 Gamma Wirkstoff. Phosphorhaltige Insektizidrückstände auf Gemüse und tierischen Produkten bestimmen BACHE u. LISK (123) mit Hilfe eines emissionsspektrometrischen Detektors, der auf die Phosphorlinie bei 2535,65 Å anspricht.

Wesentlich heruntergesetzt wird die Nachweisgrenze durch den Einsatz der mikrocoulometrischen Gaschromatographie. COULSON et al. (133) geben an, 0,25 - 0,50 Gamma Pesticid, je nach Schwefel- oder Chlorgehalt der Verbindung verschieden, erfassen zu können. Entsprechende Angaben findet man in den Arbeiten von BOSIN (125), BURCHFIELD et al. (128), BURKE u. HOLSWADE (130), CHALLACOMBE u. MC NULTY (131) und NELSON (144, 145, 146).

Ähnliche Nachweisgrenzen bei der Bestimmung halogenierter und phosphorhaltiger Insektizide erreichen GIUFFRIDA (136), GIUFFRIDA u. IVES (137) und KARMEN u. GIUFFRIDA (141) mit Hilfe eines thermionischen Detektors. Doch sind die Arbeiten, wie schon anfangs berichtet, auf diesem Gebiet noch nicht abgeschlossen.

Mit einem Gemisch von Aceton und Äthyläther extrahieren JAIN et al. (139) 23 Insektizide aus Blut. Sie erreichen mit dem Verfahren eine Wiederauffindquote von ungefähr 85%. Akute Vergiftungen lassen sich mit dieser Methode durch den Nachweis signifikanter Wirkstoffmengen im Blut feststellen.

Für die toxikologische Untersuchung von Körperflüssigkeiten und Organen auf Gamma-Mengen eines Pesticids verwenden

BRANDENBERGER u. MÜLLER (126) die Zweikanalgaschromatographie. Sie erweitern dafür ein Zweikolonnengerät durch den Einbau eines 3. Detektors sowie zweier Gasstromteiler. An die gaschromatographische Untersuchung kann eine UV- oder IR-Spektroskopische Bestimmung angeschlossen werden.

LAUTENBACH (142) bestimmt Spuren der jeweiligen flüchtigen Begleitstoffe des eigentlichen Giftes. Diese weist er mit Hilfe eines WLD und eines FID auf verschiedenen Säulen bei über 20 Vergiftungsfällen mit E 605, Metasystox und Phosdrin nach. Als Ausgangsmaterial dienen Mageninhalt, Reste der Vergiftungsflüssigkeit, Blut und Harn. Zur weiteren Untersuchung verwendet er zusätzlich die Massenspektroskopie.

Wie die vorliegende Literaturübersicht zeigt, haben sich die Erwartungen, die WEINIG u. LAUTENBACH (16) 1958 als erste Rechtsmediziner mit dem Einsatz der Gaschromatographie in der forensischen Toxikologie und Kriminalistik verbanden, voll erfüllt. Eine Vielzahl von Nachweismöglichkeiten ist in den letzten 10 Jahren erarbeitet worden, und sicherlich wird man besonders durch die Weiterentwicklung der spezifischen Detektoren in der nächsten Zeit doch neue Einsatzgebiete erschließen können.

Rechtsmedizin (allgemein)

1. BOBER, H.: Die Zweikolonnentechnik in der Gaschromatographie unter besonderer Berücksichtigung eines neuen Dreiwegventils
Beckman Report 3, 3 (1964)
2. BOBER, H.: Über die Zweikolonnentechnik in der Gaschromatographie, ihre Möglichkeiten und optimale Durchführung
GIT Fachzeitschrift f. das Laboratorium 13, 181 (1969)
3. BRAHM-VOGELSANGER, A. und H.J. WAGNER: Gaschromatographische Direktuntersuchung biologischen Materials
Dtsch.Z.ges.gerichtl.Med. 55, 137 (1964)
4. BRANDENBERGER, H.: Bedeutung der Gaschromatographie in der chemischen Forensik
Kriminalistik 19, 558 (1965)
5. BURCHFIELD, H.P. and E.E. STORRS: Biochemical applications of gaschromatography
Academic Press, New York and London 1962
6. CADMAN, W.J.: The application of gas chromatography in forensic science
Methods Forensic Sci. 2, 127 (1963)
7. CADMAN, W.J. and T. JOHNS: Application of the gas chromatograph in the laboratory of criminalistics
J. Forensic Sci. 5, 369 (1960)
8. DERGE, K.: Anwendungsbeispiele der Gas-Chromatographie in der Medizin
Ärztl. Lab. 10, 298 (1964)
9. DE ZORZI, C.: Forensic Toxicological Applications of Infrared Spectrometry Coupled With Gas Chromatography
Zacchia 27, 492 (1964); vgl. Chem. Abstr. 65, 9326e
10. GADAMER, J.: Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte
3. Auflage, Vandenhoek u. Ruprecht, Göttingen 1966
11. GOLDBAUM, L.R., E.L. SCHLOEGEL and A.M. DOMINGUEZ: Application of Gas Chromatography to Toxicology
Progress in Chemical Toxicology, Ed. A. Stolman
Vol. 1, New York 1963

12. MACHATA, G.: Neuere Methoden der Gaschromatographie, besonders für die gerichtliche Medizin
Oesterr. Chemiker-Ztg. 66, 1 (1965)

13. - Analytische Verfahren der naturwissenschaftlichen Kriminalistik
Fortschritte der chemischen Forschung, Springer-Verlag, Band 6, Heft 4, 659 (1966)

14. MARICQ, L. et L. MOLLE: Quelques application de la chromatographie gazeuse a l'analyse toxicologique
J. Pharm. Belg. 1960, 405

15. NANIKAWA, R. und S. KOTOKU: Gaschromatographie für gerichtsmedizinische Zwecke. Begutachtung von 6 Fällen
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 58, 55 (1966)

16. WEINIG, E. und L. LAUTENBACH: Die Gaschromatographie als neue Methode in der forensischen Toxikologie und Kriminalistik
Arch. Kriminol. 122, 11 (1958)

11a. GUDZINOWICZ, B.J.: Gas Chromatographic Analysis of Drugs and Pesticides
Marcel Dekker, Inc., New York 1967

15a. SZYMANSKI,H.A.: Biomedical Applications of Gas Chromatography
Plenum Press, New York 1964

Blutalkohol

17. BOBER, H.: Die gaschromatographische Bestimmung von Alkoholen im Blut nach der Methode der Zweikolonnentechnik
Beckman Report 2, 24 (1965)

18. CHUNDELA, B. and J. JANAK: Quantitative determination of ethanol besides other substances in blood and other body liquids by gas chromatography
J. forensic Med. 7, 153 (1960)

19. DAVIS, R.A.: The Determination of Ethanol in Blood or Tissue by Gas Chromatography
J. Forensic Sci. 11, 205 (1966)

20. DIETZE, S.: Gaschromatographische Bestimmung von Äthylalkohol im Blut
Beckman Report 4, 6 (1959)

21. DRAWERT, F., R. FELGENHAUER und G. KUPFER: Reaktions-Gaschromatographie zur Analyse von Alkoholen und zur Blut-Alkoholbestimmung
Angew. Chem. 72, 385 (1960)

22. - Reaktions-Gaschromatographie
Angew. Chem. 72, 555 (1960)

23. DRAWERT, F. und G. KUPFER: Reaktions-Gaschromatographie V, Analyse von Blut-Alkohol
Hoppe Seylers Z. f. physiol. Chemie 329, 90 (1962)

24. DURITZ, G. and E.B. TRUITT, Jr.: A Rapid Method for the Simultaneous Determination of Acetaldehyd and Ethanol in Blood using Gas Chromatography
Quart. J. of Studies on Alcohol 25, 498 (1964)

25. FOX, J.E.: Gas chromatographic analysis of alcohol and certain others volatiles in biological materials for forensic purposes
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97, 236 (1958)

26. FREUDIGER, J.B. and J.A. VIGNAU: Determination of alcohols in body fluids by gas-liquid chromatography
J. Forensic Sci. 10, 73 (1965)

27. FRITZ, D., T. GARZO, F. TILL and M. SCHILLER: Gas chromatographic determination of ethanol in blood
Magy. Kem. Folyoirat 71, 160 (1965); vgl. Chem. Abstr. 63, 6007f

28. HESSEL, H.W. and F.R. MODGLIN: The Quantitative Determination of Ethanol and Other Volatile Substances in Blood by Gas-Liquid Partition Chromatography
J. Forensic Sci. 9, 255 (1964)

29. HEYNDRICKX, A., E. VAN DEN BUSSCHE and V. COULIER: Determination of ethyl- and methylalcohol in blood by gaschromatography. Distribution of ethylalcohol in a human foetus
J. Pharm. Belg. 1961, 334

30. JANITZKI, U.: Über den gaschromatographischen Nachweis flüchtiger Substanzen im Blut nach Aufnahme durch die Atemwege
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.52, 22 (1961)

31. JANITZKI, U. und S. GOENECHA: Gaschromatographie und Widmarkmethode bei der quantitativen Methanolbestimmung im biologischen Material
Arch. Kriminol. 142, 91 (1968)

32. JENTZSCH, D., H. KRÜGER, G. LEBRECHT, G. DENCKS und J. GUT: Arbeitsweise zur automatischen gas-chromatographischen Dampfraum-Analyse
Z. Anal. Chem. 236, 96 (1968)

33. LASKARIS, M.A., J.A. SCHMIT and H.L. ASHMED: A rapid Method for the Determination of Alcohols in Biological Fluids: Gas Chromatography of Ethyl Alcohols
Facts + Methods for Scient. Res. 4, 8 (1963)

34. LAUTENBACH, L.: Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen über das Auftreten leichtflüchtiger Verbindungen bei der Leichenfäulnis
Habilitationsschrift 1968

35. MC CORD, W.M. and R.H. GADSEN: The Identification and Determination of Alcohols in Blood by Gas Chromatography
J. Gas Chromatog. 2, 38 (1964)

36. MACHATA, G.: Die Routineuntersuchung der Blutalkohol-konzentration mit dem Gaschromatographen
Mikrochim. Acta 1962, 691

37. - Über die gaschromatographische Blutalkoholbestimmung. Analyse der Dampfphase
Mikrochim. Acta 1964, 262

38. - Über die gaschromatographische Blutalkoholbestimmung
Blutalkohol IV, 252 (1967)

39. MARICQ, L. et L. MOLLE: Recherches sur la détermination de l'alcoolémie par chromatographie gazeuse
Bull. Acad. roy. méd. Belg. 14, 199 (1959)

40. MATHER, A. and A. ASSIMOS: Evaluation of gas-liquid chromatography in assays for blood volatiles
Clin. Chem. 11, 1023 (1965)

41. MATUMOTO, H.: Studies on the micro-determination of alcohol. III. Gas-chromatographic analysis of ethanol
Jap. J. Leg. Med. 14, 420 (1960); zit. nach Lautenbach (34).

42. NATELSON, S. and R.L. STELLATE: Instrumentation for the concentration of trace conponents of a mixture for gas chromatography; application to the determination of acetone, ethanol, methanol, and 2-propanol in Blood.
Microchem. J. 9, 245 (1965)

43. OSTERHAUS, E. und K. JOHANNSMEIER: Gaschromatographische Bestimmung von Alkoholen, Äther und Aceton im Blut und Urin
Blutalkohol II, 65 (1963/64)

44. PARKER, K.D., C.R. FONTAN, J.L. YEE and P.L. KIRK: Gas chromatographic determination of ethylalcohol in blood for medicolegal purposes. Separation of other Volatiles from blood or aqueous solution.
Anal. Chem. 34, 1234 (1962)

45. SCHLUNEGGER, U.P.: Zur gaschromatographischen Trennung von aliphatischen, sauerstoffhaltigen Substanzen in Wasser. I. Eine neue polare, flüssige Phase
J. Chromatog. 20, 23 (1965)

46. -: - III. Ein neues Trennmaterial zum Nachweis kleiner Methanolmengen in wäßrigen Lösungen
J. Chromatog. 22, 229 (1966)

47. SCHLUNEGGER, U.P.: Zur gaschromatographischen Trennung von aliphatischen, sauerstoffhaltigen Substanzen in Wasser. IV. Eine neue Trennsäule zur direkten, quantitativen Bestimmung von Äthanol in wäßriger Lösung für forensische Zwecke.
J. Chromatog. 26, 1 (1967)

48. - Ein Probeneinlaß zur direkten gaschromatographischen Bestimmung von leicht-flüchtigen Bestandteilen im Vollblut
J. Chromatog. 27, 237 (1967)

49. - Eine präzise und einfache gaschromatographische Methode zur direkten Bestimmung von Alkoholkonzentrationen im Vollblut.
Dtsch. Z. gerichtl. Med. 62, 212 (1968)

50. SKRABANEK, P. und J. NOVAK: Bestimmung des Blutaethylalkohols mittels der Gaschromatographie
Blutalkohol III, 271 (1965/66)

51. STEINBERG, M., J.B. NASH and J.Q. WALKER: Quantitation of Alcohol Using Gas Chromatography and a 15% Hallcomid Column
J. Forensic Sci. 10, 201 (1965)

52. STONE, H.M.: Determination of ethanol in body fluids by gas chromatography
New Zealand J. Sci. 8, 190 (1965); vgl. Chem. Abstr. 63, 11978g

53. WALLACE, J.E. and E.V. DAHL: Rapid Vapor Phase Method for Determining Ethanol in Blood and Urine by Gas Chromatography
Am. J. Clin. Pathol. 46, 152 (1966)

54. WOLTHERS, H.: Vapour fractometry (gas chromatography). Separation of primary, aliphatic alcohols (C_1 - C_5) in dilute, aqueous solutions. Description of a simple experimental apparatus.
Acta Med. Leg. (Liège) 9, 325 (1956)

Gase in Blut und Alveolarluft

55. AYRES, S.M., A. CRISCITIELLO and S. GIANELLI: Determination of blood carbon monoxide content by gas chromatography
J. Appl. Physiol. 21, 1368 (1966)

56. CURRY, A.S., G. HURST, N.R. KENT and H. POWELL: Rapid screening of blood samples for volatile poisons by gas chromatography
Nature 195, 603 (1962)

57. GADSEN, R.H. and W.M. MC CORD: A Preparative Technique for Quantitation of Volatile Materials by Gas Chromatography
J. Gaschromatog. 2, 7 (1964)

58. GOLDBAUM, L.R., T.J. DOMANSKI and E.L. SCHLOEGEL: Analysis of biological specimes for volatile compounds by gas chromatography
J. Forensic Sci. 9, 63 (1964)

59. HILL, D.W. and R.A. BUTLER: Estimation of Volatile Anaesthetics in Tissues by Gas Chromatography
Nature 189, 488 (1961)

59a. BUTLER, R.A. and J. FREEMAN: Gas Chromatography as a Method for Estimating Concentrations of Volatile Anaesthetics in Blood
Brit. J. Anaesthesia 34, 440 (1962)

60. MACHATA, G.: Der Äthergehalt in Körperflüssigkeiten bei Narkose
Blutalkohol IV, 345 (1967)

61. - Die Differenzierung der Kohlenoxidvergiftung
Archiv f. Toxikologie 23, 136 (1968)

62. MARICQ, L. et L. MOLLE: Détermination simultanée de l'etheroxyde d'éthyle et de l'éthanol dans le sang et les viscères par chromatographie gazeuse
Ann. Pharm. Franc. 18, 811 (1960)

63. MERLI, S. and C. DE ZORZI: Determination of ether in blood by gas chromatography
Archiv Hig. Rada Toksikol. 15, 189 (1964); vgl. Chem. Abstr. 63, 2245c

64. NOEHREN, T.H. and J.W. CUDMORE: Ethyl ether content in blood as determined by gas chromatography
Anaesthesiology 22, 519 (1961)
65. NORTHINGTON, M.S. and G. OWENS: Determination of Blood Ether Levels by Gas-Liquid Chromatography
Anal. Biochem. 9, 48 (1964)
66. SUMMERS, F.W. and J. ADRIANI: Gas Chromatography: An Analytical Method for Anaesthesiology Research
Anaesthesiology 22, 100 (1961)
67. WILSON, R.H.: Biologic Applications of Gas Chromatography
J. Gas Chromatog. 2, 365 (1964)

Lösungsmittel

68. BOLTZ, W., G. MACHATA und O. SKALA: Zur Kenntnis der subakuten Vergiftung mit Aethylenglykol
Beiträge zur gerichtl. Med. 22, 42
69. CHUNDELA, B., M. KREJCI und M. RUSEK: Einige Möglichkeiten der Verwendung des Zweibrennerflammendetektors zur Bestimmung chlorierter organischer Stoffe in der Toxikologie
Dtsch. Z. gerichtl. Med. 63, 154 (1968)
70. FELDSTEIN, M.: Application of infrared spectrophotometry and gas-liquid chromatography to the analysis of volatile substances
J. Forensic Sci. 5, 266 (1960)
71. HAUCK, G.: Der gaschromatographische Nachweis von Lösungsmitteln
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 59, 300 (1967)
72. KOVATS, E.: Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde and Ketone
Helv. Chim. Acta 41, 1915 (1958)
73. LUCAS, D.M.: The identification of petroleum products in forensic science by gas chromatography
J. Forensic Sci. 5, 236 (1960)
74. MACHATA, G.: Anwendung der Gaschromatographie in der toxikologischen Analyse
Arch. Toxikol. 18, 338 (1960)

75. MACHATA, G.: Anwendung neuerer Verfahren in der naturwissenschaftlichen Kriminalistik
Arch. Kriminol. 127, 1 (1961)
76. PARKER, B.P., P. RAJESWARAN and P.L.KIRK: Identification of fire accelerants by vapor-phase chromatography
Microchem. J. 6, 31 (1962)
77. SADOWSKI, F. and H. WAGNER: Gas chromatography and its use in the analysis of laquer solvents
Plaste u. Kautschuk 7, 103 (1960); vgl. Chem. Abstr. 54, 15955b
78. SCHLUNEGGER, U.P.:Gaschromatographischer Nachweis von Benzinintoxikation in Blut von Ratten
Arch. Toxikol. 22, 252 (1967)
79. WEYRICH, G., G. HAUCK und V. ZIMMER: Über die Anwendung der Gaschromatographie in der forensischen Toxikologie
Med. Welt 1967, 119

Barbiturate

80. ANDERS, M.W.: Rapid Micromethod for Gas Chromatographic Determination of Blood Barbiturates
Anal. Chem. 38, 1945 (1966)
81. ARNOLD, W.: Die Barbiturate und ihre gerichtsmedizinische Bedeutung
Habilitationsschrift 1967
82. BAERHEIM-SVENDSEN, A. and E. BROCHMANN-HANSSEN: Gas chromatography of barbiturates. II. Application to the study of their metabolism and excretion in humans
J. Pharm. Sci. 51, 494 (1962)
83. BATTISTA, H.J. und G. MACHATA: Kombination von Gas-Chromatographie und Dünnschicht-Chromatographie in der Toxikologischen Analyse
Chromatographia 1, 104 (1968)
84. BRADDOCK, L.J. and N. MAREC: Gas chromatographic analysis of sub-microgram quantities of barbiturates by using a flame ionization detector
J. Gas Chromatog. 3, 274 (1965)

85. BROCHMANN-HANSSEN, E. and A. BAERHEIM-SVENDSEN: Gas chromatography of barbiturates and related compounds
J. Pharm. Sci. 50, 804 (1961)

86. - Separation and identification of barbiturates and some related compounds by gas-liquid chromatography
J. Pharm. Sci. 51, 318 (1962)

87. CIEPLINSKI, E.W.: Prevention of Peak Tailing in the Direct Gas Chromatographic Analysis of Barbiturates
Anal. Chem. 35, 256 (1963)

88. COOK, J.G.H., C. RILEY, R.F. NUNN and D.E. BUDGEN: Gas Chromatography of Methyl Derivatives of Some Barbiturates
J. Chromatog. 6, 182 (1961)

89. GUDZINOWICZ, B.J. and S.J. CLARK: The Gas Chromatographic Analysis of Low Concentrations of Barbiturates Using an Electron Affinity Detector
J. Gas Chromatog. 3, 147 (1965)

90. JAIN, N.C., C.R. FONTAN and P.L. KIRK: Rapid Extraction Method for Barbiturates from Blood for Gas-Liquid Chromatographic Analysis
Microchem. J. 8, 28 (1964)

91. JANAK, J.: Identification of the Structure of Nonvolatile Organic Substances by Gas Chromatography of Pyrolytic Products
Nature 185, 684 (1960)

92. - Identification of Organic Substances by Gas-chromatographic Analysis of Their Pyrolysis Products
Gas Chromatog., Proc. Symposium, 3rd, Edinburgh 1960,387

93. JANITZKI, U.: Gaschromatographische Differenzierung von Barbituraten
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 57, 352 (1966)

94. KAZYAK, L. and E.C. KNOBLOCK: Application of Gas Chromatography to Analytical Toxicology
Anal. Chem. 35, 1448 (1963)

95. MACHATA, G. und H.J. BATTISTA: Gaschromatographische Barbituratbestimmung
Mikrochim. Acta 1968, 866

96. MARTIN, H.F. and J.L. DRISCOLL: Gas Chromatographic Identification and Determination of Barbiturates
Anal. Chem. 38, 345 (1966)

97. NELSON, D.F. and P.L. KIRK: Identification of Substituted Barbituric Acids by Gas Chromatography of Their Pyrolysis Products
Anal. Chem. 34, 899 (1962)
98. - Identification of the Pyrolyzates of Substituted Barbituric Acids by Gas Chromatography
Anal. Chem. 36, 875 (1964)
99. PARKER, K.D. and P.L. KIRK: Separation and Identification of Barbiturates by Gas Chromatography
Anal. Chem. 33, 1378 (1961)
100. PARKER, K.D., C.R. FONTAN and P.L. KIRK: Improved Gas Chromatographic Column for Barbiturates
Anal. Chem. 35, 418 (1963)
101. REITH, J.F., R.F. VAN DER HEIDE and R.F.A. ZWAAL: Gas Chromatography of Barbiturates in Blood
Pharm. Weekblad 100, 219 (1965); vgl. Chem. Abstr. 63, 6228b
102. VAN DEN HEUVEL, W.J.A., E.O.A. HAAHTI and E.C. HORNING: Gas-Chromatographic Separations of Drugs and Drug Metabolites
Clin. Chem. 8, 351 (1962)

Alkaloide

103. ANDERS, M.W. and G.J. MANNERING: Gas Chromatography of Some Pharmacologically Active Phenothiazines
J. Chromatog. 7, 258 (1962)
104. VAN BINST, G., L. DENOLIN-DEWAERSEGGER et R.H. MARTIN: Application de la Chromatographie en phase gazeuse à l'étude des Produits de Pyrolyse d'alcaloides indoliques. I. Obtention des pyrogrammes
J. Chromatog. 16, 34 (1964)
105. BROCHMANN-HANSSEN, E. and A. BAERHEIM-SVENDSEN:Gas Chromatography of Sympathomimetic Amines
J. Pharm. Sci. 51, 393 (1962)
106. - Gas Chromatography of Alkaloids, Alkaloid Salts, and Derivatives
J. Pharm. Sci. 51, 1095 (1962)

107. - Quantitative Determination of Morphine in Opium by Gas-Liquid Chromatography
J. Pharm. Sci. 52, 1134 (1963)

108. BROCHMANN-HANSSEN, E. and T. FURUYA: Opium Alkaloids. Separation and Identification by Gas, Thin-Layer, and Paper Chromatography
J. Pharm. Sci. 53, 1549 (1964)

109. BROCHMANN-HANSSEN, E. and C.R. FONTAN: Gas Chromatography of Alkaloids with Polar Stationary Liquids
J. Chromatog. 19, 296 (1965)

110. - Gas Chromatography of Alkaloids With Polar Stationary Liquids. II. Effect of poly(vinylpyrrolidinone) Treatment of the Support
J. Chromatog. 20, 394 (1965)

111. CARTONI, G.P. and F. DE STEFANO: Determination of Amphetamine by Means of Gas Chromatography. Urinary Excretion in the Rat and Man.
Giorn. Biochim. 12, 298 (1963); vgl. Chem. Abstr. 60, 8493h

112. FALZI, G., N. GRUDEN und E. MAROZZI: Der Nachweis von Arzneimitteln in Leichenorganen nach therapeutischen Dosen mit verschiedenen forensisch-toxikologischen Methoden
Dtsch. Z. gerichtl. Med. 61, 81 (1967)

113. FONTAN, C.R., W.C. SMITH and P.L. KIRK: Gas Chromatography of the Antihistamines
Anal. Chem. 35, 591 (1963)

114. FONTAN, C.R., N.C. JAIN and P.L. KIRK: Identification of the Phenothiazines by Gas Chromatography of Their Pyrolysis Products
Microchim. Ichnoanal. Acta 1964, 326; vgl. Chem. Abstr. 61, 3700g

115. FRAUENDORF, H. und H. VOGEL: Über die gaschromatographische Trennung der Tropanalkaloide
Z. Anal. Chem. 205, 460 (1964)

116. GUDZINOWICZ, B.J., H.F. MARTIN and J.L. DRISCOLL: Gas-Chromatographic Analysis of Thermal Decomposition Products of Chlorpromazine, Chlorpromazine S-oxide, and Chlorpromazine N-oxide
J. Gas Chromatog. 2, 265 (1964)

117. KINGSTON, C.R. and P.L. KIRK: Some Statistical Aspects of Pyrolysis-GLC (gas-liquid chromatography) in the Identification of Alkaloids
Bull. Narcotics 17, 19 (1965); vgl. Chem. Abstr. 64, 17354g

118. LLOYD, H.A., H.M. FALES, P.F. HIGHET, W.J.A. VAN DEN HEUVEL and W.C. WILDMAN: Separation of Alkaloids by Gas Chromatography
J. Amer. chem. Soc. 82, 3791 (1960)

119. MAC DONALD, A. Jr. and R.T. PFLAUM: Gas Chromatography of Some Antihistamines
J. Pharm. Sci. 53, 887 (1964)

120. MASSINGILL, J.L. Jr. and J.E. HODGKINS: Gas Liquid Chromatography of Alkaloids Using Capillary Columns and Four Packed Columns
Anal. Chem. 37, 952 (1965)

121. PARKER, K.D., C.R. FONTAN and P.L. KIRK: Rapid Gas Chromatographic Method for Screening of Toxicological Extracts for Alkaloids, Barbiturates, Sympathomimetic Amines, and Tranquilizers
Anal. Chem. 35, 356 (1963)

122. VESSMAN, J.: Gas Chromatography of High-Boiling Amines. II. Determination of Amines in Low Concentration
Acta Pharm. Suecica 1, 183 (1964); vgl. Chem. Abstr. 62, 8939h

Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel

123. BACHE, C.A., and D.J. LISK: Determination of Organophosphorus Insecticide Residues Using the Emission Spectrometric Detector
Anal. Chem. 37, 1477 (1965)

124. BARRETTE, J.P. and R. PAYFER: Gas Chromatographic Analysis of Pesticide Formulations
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 47, 259 (1964)

125. BOSIN, W.A.: Analysis of Pesticides Residues Using Micro-Coulometric Temperature-Programmed Gas Chromatography
Anal. Chem. 35, 833 (1963)

126. BRANDENBERGER, H. und S. MÜLLER: Über den Nachweis von Pesticiden durch Kombination von Zweikanalgaschromatographie mit Spektrophotometrie
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 56, 281 (1965)

127. BURCHFIELD, H.P., D.E. JOHNSON, J.W. RHOADES and R.J. WHEELER: Selective Detection of Phosphorus, Sulfur, and Halogen Compounds in the Gas Chromatography of Drugs and Pesticides
J. Gas Chromatog. 3, 28 (1965)

128. BURCHFIELD, H.P., J.W. RHOADES and R.J. WHEELER: Simultaneous and Selective Detection of Phosphorus, Sulfur, and Halogen in Pesticides by Microcoulometric Gas Chromatography
J. Agr. Food Chem. 13, 511 (1965)

129. BURKE, J.A.: Gas Chromatography for Pesticide Residue Analysis; Some Practical Aspects
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 48, 1037 (1965)

130. BURKE, J.A. and W. HOLSWADE: Gas Chromatographic Column for Pesticide Residue Analysis; Retention Times and Response Data
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 49, 374 (1966)

131. CHALLACOMBE, J.A. and J.A. MC NULTY: Application of the Microcoulometric Titrating System as a Detector in Gas Chromatography of Pesticide Residues
In: Residue Reviews, ed. by F.A. Gunther, Springer Verlag Berlin (1964), vol. 5, 57

132. COULSON, D.M., L.A. CAVANAGH and J. STUART: Gas Chromatography of Pesticides
J. Agr. Food Chem. 7, 250 (1959)

133. COULSON, D.M., L.A. CAVANAGH, J.E. DE VRIES and B. WALTHER: Microcoulometric Gas Chromatography of Pesticides
J. Agr. Food Chem. 8, 399 (1960)

134. EGAN, H., E.W. HAMMOND and J. THOMSON: The Analysis of Organophosphorus Pesticide Residues by Gas Chromatography
Analyst 89, 175 (1964)

135. GELDMACHER-V.MALLINCKRODT, M.: Der forensische Nachweis von Insektiziden der Systoxgruppe
Schmidt-Römhild Lübeck 1967, S. 69

136. GIUFFRIDA, L.: A Flame Ionization Detector Highly Selective and Sensitive to Phosphorus. A Sodium Thermionic Detector
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 47, 293 (1964)

137. GIUFFRIDA, L. and F. IVES: Two Gas-Chromatographic Techniques for the Determination of Organophosphate Pesticide Residues
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 47, 1112 (1964)

138. HINDIN, E., D.S. MAY and G.H. DUNSTAN: Collection and Analysis of Synthetic Organic Pesticides from Surface and Ground Water
In: Residue Reviews, ed. by F.A. Gunther, Springer-Verlag, Vol. 7, 130 (1964)

139. JAIN, N.C., C.R. FONTAN and P.L. KIRK: Simplified Gas Chromatographic Analysis of Pesticides from Blood
J. Pharm. Pharmacol. 17, 362 (1965)

140. KANAZAWA, L., H. KUBO and R. SATO: Gas-Liquid Chromatography of Organophosphorus Pesticides
Agr. Biol. Chem. 29, 56 (1965)

141, KARMEN, A. and L. GIUFFRIDA: Enhancement of the Response of the Hydrogen Flame Ionisation Detector to Compounds Containing Halogens and Phosphorus
Nature 201, 1204 (1964)

142. LAUTENBACH, L.: Flüchtige Begleitstoffe in Pflanzenschutzmitteln
Arch. Kriminol. 140, 145 (1967)

143. MAGGS, J. and D.F.K.SWAN: Evaluation of an Electron-Capture-Detector
Column 1, 2 (1966)

144. NELSON, R.C.: Screening Procedure for Organothiophosphate Pesticide Residues on Fruit and Vegetables by Microcoulometric Gas Chromatography
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 47, 289 (1964)

145. - Screening Procedure for Organothiophosphate Pesticide Residues on Fruit and Vegetables Using Microcoulometric Gas Chromatography
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 48, 752 (1965)

146. - Screening Procedure for Organothiophosphate Pesticide Residues on Fruit and Vegetables by Microcoulometric Gas Chromatography
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 49, 763 (1966)

147. SAMUEL, B.L. and H.K. HODGES: Screening Methods for Organochlorine and Organophosphate Insecticides in Foods and Feeds
Residue Reviews 17, 35 (1967)

148. WEINIG, E., L. LAUTENBACH und M. GELDMACHER-V.MALLINCKRODT: Gaschromatographische Studien zum Nachweis von Metasystox
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 51, 565 (1961)

III. DER GASCHROMATOGRAPHISCHE NACHWEIS VON HISTAMIN IN DER RECHTSMEDIZIN

Im vorangehenden Teil wurden Nachweismethoden besprochen, deren Ausarbeitung teilweise bereits auf rechtsmedizinischen Fragestellungen beruhen, oder aber doch zumindest von Materialien ausgehen, die in der Rechtsmedizin vorliegen. Wie verhält es sich nun aber mit Methoden, denen rein biochemische Fragestellungen zugrunde liegen, die also das in der Rechtsmedizin gegebene Ausgangsmaterial unberücksichtigt lassen? Kann man diese Methoden dann ohne weiteres übertragen?

Unsere Aufgabenstellung war folgende: der Histamingehalt im Leichenblut sollte bestimmt werden, und zwar mit einer empfindlicheren Methode, als den bisher angewendeten. Da die Gaschromatographie als ein sehr empfindliches Verfahren bekannt ist, sollte ein solches erarbeitet werden. Gaschromatographische Methoden, die von Leichenblut ausgehen, waren uns nicht bekannt. Uns lagen nur Arbeiten vor, in denen Histamin als Reinsubstanz oder in wäßriger Lösung und Urin bestimmt wird.

1. BEDEUTUNG DES HISTAMINS FÜR DIE RECHTSMEDIZIN

Unter dem Begriff Agonie versteht man einen labilen Gleichgewichtszustand zwischen Leben und Tod. Beginn dieser Phase stellt eine lebensbedrohliche Herabsetzung der Funktionen des Organismus dar. Das Ende der Agonie bildet der Tod. Nach LAVES (1965) unterscheidet man je nach ihrer Dauer 4 Agonietypen. Typ 1 ist eigentlich keine Agonie. In diesen Fällen tritt der Tod schlagartig auf, zum Beispiel beim Flugzeugabsturz. Das Geschehen läuft in so rascher Zeit und unter so großer Gewalteinwirkung ab, daß sich eine Agonie gar nicht mehr ausbilden kann. Typ 2 bedeutet eine sehr kurze Agonie. Hierher gehören Fälle akuten, gewaltsamen Todes, aber auch Todesfälle aus natürlicher Ursache wie der Herzinfarkt

sind hier einzuordnen. Typ 3 ist eine lange Agonie. Man findet sie vornehmlich bei chronischen Erkrankungen. Von Typ 4 spricht man, wenn die Agonie durch Reanimation verlängert ist. In der Agonie auftretende chemische Veränderungen lassen sich besonders gut bei einer Agonie des Typs 2 feststellen, da die Reaktionen hier sehr foudroyant verlaufen.

Histamin ist ein im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitetes Amin. Im Tierreich ist der Gehalt an Histamin in den einzelnen Geweben verschieden, wobei die Verteilung auf die einzelnen Gewebe spezieseigentümlich ist. Beim Menschen finden sich die höchsten Histaminkonzentrationen in der Lunge, in der Haut und im Gastointestinaltrakt. Sie liegen bei 0,01 mg/g Gewebe. Der Wert im Gesamtblut liegt bei 0,002 - 0,1 ug/ml. Gespeichert wird das biogene Amin in den Gewebs- und Mastzellen. Der Aufbau erfolgt im Organismus selbst durch Decarboxylierung von Histidin. Außerdem wird es von Bakterien im Darm gebildet. Den Abbau besorgt eine Diaminoxydase. Vier pharmakologische Wirkungen lassen sich abgrenzen: 1. Erregung der glatten Muskulatur, 2. Erschlaffung der Gefäßmuskulatur, 3. Permeabilitätssteigerung der Kapillaren und 4. eine Sekretionssteigerung der Magenschleimhautdrüsen. Welche physiologische Bedeutung dem Histamin zukommt, ist noch nicht eindeutig geklärt.

In der Rechtsmedizin läßt sich Histamin als postmortaler Indikator agonaler Kreislaufreaktionen heranziehen. Viele der forensisch interessierenden Todesursachen sind Folge einer inneren Erstickung, die praemortal eine durch Adrenalin- und Noradrenalinausschüttung veränderte Kreislaufreaktion aufweist. Auf diese Catecholaminausschüttung antwortet der Organismus mit einer Gegenreaktion, indem er Histamin freisetzt. Das agonal ausgeschüttete Histamin wird nun aber nicht, wie es physiologischerweise geschehen würde, abgebaut, sondern bleibt, da die Diaminoxydase im Blut nur in geringen Mengen vorhanden ist und in ihrer Aktivität sauerstoff- und wärmeabhängig ist, unverändert über längere Zeit nachweisbar. Da die agonale Histaminausschüttung jedoch bei verschiedenen Todesursachen in

unterschiedlicher Menge erfolgt, läßt sich die Histaminbestimmung zur Differenzierung der Todesursache heranziehen.

2. BISHER ANGEWENDETE BESTIMMUNGSMETHODEN FÜR HISTAMIN

Als Methoden zur quantitativen Bestimmung von Histamin stehen heute biologische, colorimetrische und fluorimetrische Verfahren zur Verfügung.

Von den biologischen Verfahren gilt noch heute die 1935 von BARSOUM u. GADDUM entwickelte und 1955 von CODE u. MC INTIRE modifizierte Testung am überlebenden, atropinisierten Meerschweinchendarm als die beste Methode. Sie basiert auf der Tatsache, daß Histamin eine Erregung der glatten Muskulatur bewirkt. Ein einige Zentimeter langes Stückchen vom terminalen Ileum oder Colon wird in ein sauerstoffdurchperltes Tyrodebad von 35°C gebracht, und die Kontraktionen des Darmes bei Histaminzusatz registriert. Dabei ist die Kontraktionsgröße dem Logarithmus der Histamindosen proportional. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei 0,01 ug Histamin.

Die colorimetrischen Verfahren lassen sich auf den Tatbestand zurückführen, daß Histamin mit einer diazotierten Lösung von Sulfanilsäure bei alkalischem Milieu eine kirschrote Färbung aufweist, die bei saurer Reaktion nach Orange umschlägt. Dabei werden aber nicht nur Imidazolkörper erfaßt, sondern auch Phenolderivate, Indole und andere heterocyclische Verbindungen. Das Verfahren ist also nicht spezifisch für Histamin. Der Nachweis erfolgt dabei entweder papierchromatographisch, ausgehend von Arbeiten von MC INTIRE et al. (1947) und WILLIAMS u. KIRBY (1948), die im Laufe der Jahre weiter entwickelt wurden, oder dünnschichtchromatographisch (GRIMMET u. RICHARDS 1965). Die unter physiologischen Bedingungen im Blut vorkommenden Histaminmengen werden mit diesem Verfahren nicht erfaßt. Erst Erhöhungen des Histaminspiegels um das 2 - 3 fache können nachgewiesen werden.

Genauer und spezifischer ist das von SHORE et al. 1959 entwickelte fluorimetrische Verfahren. Grundlage dieser Nachweisreaktion ist eine Kondensreaktion mit Orthophthalsäurealdehyd, die zu starker Fluoreszenz mit einem charakteristischen Spektrum führt. Dieses Verfahren wurde weiter ausgearbeitet, so daß ZACHARIAE (1963), der das Verfahren als einfach, zeitsparend und genau bezeichnet, Recoveryquoten von 86 - 97,5 % angeben kann. Die Nachweisgrenze liegt um 0,5 ug/ml Histamin.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die biologische Methode sicherlich die genaueste und empfindlichste, gleichzeitig aber auch die aufwendigste ist, während die colorimetrische und mehr noch die fluorimetrische Methode einfacher durchzuführen, dafür aber weit weniger empfindlich ist. So wäre es sicherlich wünschenswert, wenn diese Lücke durch eine empfindlichere Methode als die fluorimetrische und weniger aufwendige als die biologische geschlossen werden könnte.

3. VERSUCHE ZUR HISTAMINBESTIMMUNG

Die Versuche wurden mit einem Gaschromatographen der Firma Hewlett & Packard, Modell 5750B, durchgeführt, Als Detektor diente ein Flammenionisationsdetektor, dessen Flamme mit H_2 und nachgereinigter synthetischer Luft (80% N_2, 20% O_2) gespeist wurde. Als Trennsäule wurde eine 6 ft. lange Glassäule, gepackt mit 10% Silicongummi UCC - W 982 auf Diazopart S, 80 - 100 mesh, benutzt.

Die Temperatur der Trennsäule betrug 200°C, es wurde isotherm gearbeitet. Die Temperatur des Einspritzblocks wurde bei 235°C, die des FID bei 230°C gehalten. Die Gase hatten folgende Drucke: N_2 = 3 atü, Luft = 3 atü, H_2 = 2 atü. Die Proben wurden mit einer 10 ul Hamilton-Spritze eingegeben.

Als Reagenzien wurden p.a. Reagenzien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet. Dem Pyridin wurden Kaliumhydroxid-

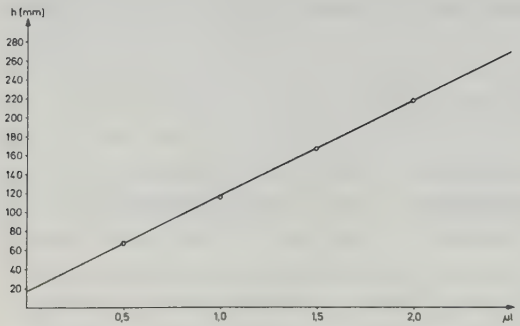
plätzchen zugegeben, um es weitgehend wasserfrei zu machen. Ein frischer Ansatz wurde vor Gebrauch jeweils einige Tage stehengelassen.

Überprüfung der technischen Ausrüstung

Mit Hilfe eines Chinolin-Acetonitril-Gemisches wurde der Gaschromatograph auf Linearität und Reproduzierbarkeit der Peaks geprüft. Um die Prüfung in dem Empfindlichkeitsbereich vornehmen zu können, in dem später mit Histamin gearbeitet wurde, setzten wir das Chinolin-Acetonitril-Gemisch in einer entsprechenden Konzentration an. Eingegeben wurden Mengen von 0,5 1,0 1,5 und 2,0 ul, je Probenmenge dreimal. Da symmetrische Peaks vorlagen, wurde die Auswertung nur durch Bestimmung der Peakhöhe durchgeführt.

eingegebene Menge	0,5 ul	1,0 ul	1,5 ul	2,0 ul
Mittelwert	67,5	116	168	219
mittl. Fehler des Mittelwertes (%)	5,14	1,26	1,39	1,26
gesamter mittl. Fehler des Mittelwertes (%)		2,26		

Wie die Tabelle zeigt, betrug der mittlere Fehler des Mittelwertes der 3 eingegebenen Proben 2,26 %, während die graphische Darstellung der Peakhöhe in Abhängigkeit von der Probenmenge zeigt, daß die Abweichung von der Linearität bei unseren Versuchen mit einem mittleren Fehler von 0,47% belastet

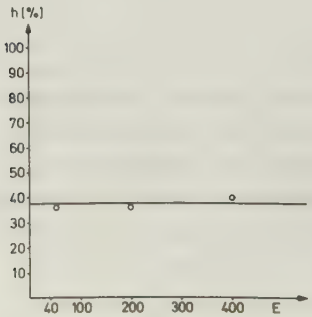


Darstellung der Peakhöhe in Abhängigkeit von der Probenmenge

war. Diese Abweichungen erschienen uns für die weiteren Messungen als zumutbar. Gleichzeitig gestattete dieser Versuch Aussagen über die Einspritztechnik. Die einzuspritzende Menge wurde also tolerierbar genau aufgezogen. Durch vorsichtiges Abstreifen der Kanüle an Filtrierpapier und 15-sekündiges Belassen der Kanüle im Einspritzblock versuchten wir möglichst konstante Einspritzbedingungen zu erhalten.

In einem weiteren Versuch wurde die Abhängigkeit der Peakhöhe von verschiedenen Empfindlichkeitsbereichen dargestellt.

E	Eingabe (ul)	mittlere Peakhöhe (%)
$10^2 \cdot 4$	2	40
$10^2 \cdot 2$	1	36
$10 \cdot 4$	0,2	36



Darstellung der Peakhöhe in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit

Wir führten diesen Versuch mit acetyliertem Histamin durch. Wie die Darstellung zeigt, ließen die Ergebnisse unserer Messungen, die sich auf

die Empfindlichkeitsbereiche $E = 4 \cdot 10^2$ bis $E = 4 \cdot 10$ erstreckten, eine lineare Empfindlichkeitsanzeige annehmen. Messungen in noch empfindlicheren Bereichen führten wir nicht aus, da uns der Eingabefehler als zu groß erschien, um noch eindeutige Aussagen machen zu können. Der dabei auftretende mittlere Fehler des Mittelwertes betrug 3,58%.

Bestimmung von Histamin als Reinsubstanz

Histamin gehört zu der Gruppe von Substanzen, die sich nicht unzersetzt und reproduzierbar verdampfen lassen. Es muß also quantitativ in eine leicht flüchtige Form überführt werden. Nach den Angaben von HORNING et al. wählten wir die Acetylierung.

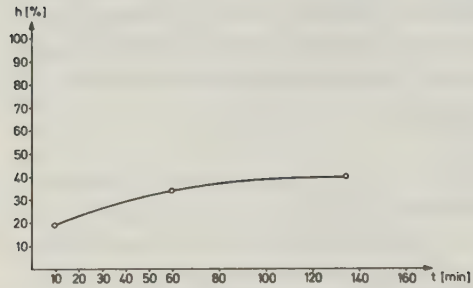
Bei der Acetylierung kommt es zur Reaktion zwischen einem Essigsäureanhydridmolekül und der primären bzw. sekundären Amin-Gruppe des Histaminmoleküls. Dabei können, abhängig vom Acetylierungsmittel, monoacetylierte oder diacetylierte Verbindungen entstehen, die beide flüchtig sind und sich für gaschromatographische Untersuchungen gut eignen.

HORNING et al. geben eine 10 mg - Menge Histamin oder äquivalente Menge Histamindihydrochlorid in 0,3 ml wasserfreies Acetonitril, dem 0,1 ml Essigsäureanhydrid und 0,1 ml Pyridin zugegeben werden. Die Lösung wird auf Rückflußtemperatur erhitzt, und der Stand der Acetylierung mit dem Gaschromatographen verfolgt.

Die angegebene 10 mg - Menge Histamin erschien uns als zu hoch. Wir erhielten bei Ansätzen mit dieser Menge keine reproduzierbaren Peaks und führten dies auf eine Überladung der Säule zurück. Die folgenden Versuche wurden darum mit 1 mg Histamin als Ausgangssubstanz durchgeführt. Um einen unvermeidlichen Pipettierfehler möglichst gering zu halten, stellten wir, quantitativ nach den gemachten Angaben, ein Gemisch aus Acetonitril, Essigsäureanhydrid und Pyridin her,

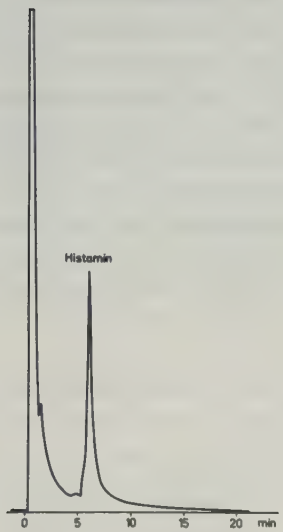
um für jede Probe nur einmal pipettieren zu müssen. Da Histamin als freie Base nicht im Handel ist, führten wir unsere Versuche mit Histamindihydrochlorid durch.

Wir modifizierten die Angaben von HORNING et al. also in folgender Weise: 1 mg Histamin, beziehungsweise 1,572 mg pulverisiertes Histamindihydrochlorid, wurde in einen 10 ml Spitzkolben eingewogen und 0,5 ml Acetonitrilgemisch hinzugefügt. Dem Ansatz gaben wir Siedesteine zu. Dies war besonders wichtig, weil bei einem zu starken Hochspritzen der Flüssigkeit die darin sich schlecht lösenden Dihydrochloridkristalle hochgeschleudert wären. Dieser Vorgang hätte quantitative Untersuchungen unmöglich gemacht. Der Kolben wurde an einem Rückflußkühler gebracht und in einem Paraffinbad auf 105°C erhitzt. Um den Stand der Acetylierung zu verfolgen, wurden nach 10 Minuten, 1 Stunde und 2 1/4 Stunden jeweils zwei Proben eingegeben. Der graphischen Darstellung kann man entnehmen, daß nach einer Stunde die Probe voll durchacetyliert zu sein schien. Durch ein weiteres Erhitzen ließen sich keine wesentlichen Änderungen mehr feststellen. Die Schwankungen, die die Werte von 1 Stunde und 2 1/4 Stunden zeigen, liegen durchaus innerhalb der Fehlerbreite, die auch bei späteren Versuchen mit Histamin auftraten. Man konnte aus diesem Versuch also schließen, daß ein Erhitzen des Gemisches auf 105°C während 1 Stunde für eine Acetylierung ausreichend war.



Darstellung der Peakhöhe in Abhängigkeit von der Acetylierungszeit

In einem nächsten Versuch gaben wir alle 20 Minuten eine Probe auf und werteten die Peaks auf ihre Reproduzierbarkeit hin aus. Der Versuch erstreckte sich auf einen Zeitraum von 18 Stunden. Um quantitativ möglichst genau zu arbeiten, führten wir vor und nach dem Erhitzen eine Wägung durch und füllten die durch Abdampfen verlorene Flüssigkeitsmenge mit Hilfe einer Kapillarpipette wieder auf. Die Versuchsergebnisse zeigten, daß die Reproduzierbarkeit der Peaks mit einem mittleren Fehler des Mittelwertes von 5,65% belastet war. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Peakhöhe. Außerdem konnten wir beobachten, daß sich das Gemisch in einem stabilen Zustand befand, denn auch ein Stehenlassen der Probe über Nacht zeigte keine wesentlichen Abweichungen.



Histaminbestimmung aus Reinsubstanz

Versuche zur Histaminbestimmung in Leichenblut

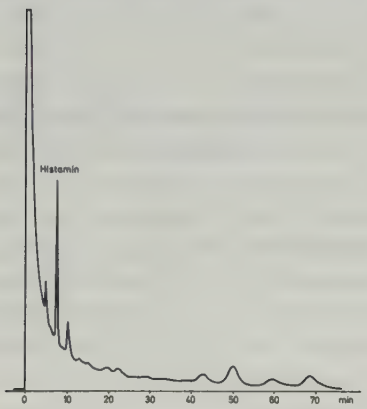
Bei unseren Versuchen zur Bestimmung von Histamin aus Leichenblut stützten wir uns auf Angaben aus der Arbeit von BROOKS u. HORNING. Es wird dort eine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung von Aminen in wäßrigen Lösungen gegeben. Dabei werden die Amine einmal in einer Ausgangslösung von 100 ml Wasser bestimmt sowie in 100 ml Urin. Die Arbeitsvorschrift

eignet sich also auch zur Bestimmung von Aminen in biologischem Material.

Dem Histamin wurde 100 ml Wasser zugefügt, die Lösung mit festem Kaliumkarbonat gepuffert und Essigsäureanhydrid in Portionen von 10, 5 und 5 ml über einen Zeitraum von 2 Stunden zugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zufügen von festem Kaliumkarbonat über 8 gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht stehengelassen und dann mit insgesamt 300 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Wir führten diese Extraktion 3 mal mit jeweils 100 ml Essigsäureäthylester durch. Der Extrakt wurde dann mit wäßrigem Natriumacetat und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend evaporierten wir den Extrakt und acetylierten die trockene Substanz nach der oben beschriebenen Pyrimidinmethode zu Ende.

Die Wiederauffindquote, die wir mit diesem Verfahren erzielten, lag bei 20%. In der vorliegenden Arbeitsvorschrift wurde sie mit 30 - 40% angegeben. Allerdings bezog sich diese Angabe nicht auf Histamin, sondern auf Octopamin und Normetanephrin.

Dasselbe Verfahren versuchten wir nun auch auf in Serum gelöstes Histamin anzuwenden. Versuche, das Extraktionsverfahren direkt am Serum anzuwenden, schlugen fehl. Es kam beim Hinzufügen von Essigsäureanhydrid zu einer massiven Eiweißkoagulation, die jegliches Weiterarbeiten verhinderte. Wir versetzten deshalb das Serum, wir gingen von 3 ml aus, mit etwa der zehnfachen Menge Wasser und führten dann die beschriebene Extraktion durch. Bessere Ergebnisse erzielten wir, nachdem wir das Serum mit 100 ml Wasser versetzten.



Nachweis von Histamin in Serum

Dieser Effekt läßt sich sicherlich darauf zurückführen, daß bei der geringeren zugesetzten Wassermenge doch noch eine Eiweißkoagulation eintrat, bei der Histamin mit eingeschlossen wurde.

Wir konnten für die Extraktion des Histamin aus Serum eine annähernd gleiche Wiederauffindquote feststellen wie bei der Extraktion aus Wasser. Dieser Befund stimmte mit den Angaben überein, die BROOKS u. HORNING für Extraktionen aus Wasser und Urin machten.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die angegebene Methode zur Extraktion von Aminen aus wäßrigen Lösungen durchaus auch auf Extraktionen aus Serum anzuwenden ist. Ganz allgemein erschien uns allerdings eine Methode, die eine so geringe Wiederauffindquote aufweist und damit sicherlich mit einem hohen Fehler belastet ist, als nicht sehr geeignet, um anschließend eine quantitative Bestimmung durchzuführen.

4. DISKUSSION DER ANWENDBARKEIT DER ERARBEITETEN METHODE

Welche Aussagen lassen sich nun aus den Ergebnissen dieser Versuche zu unserer Ausgangsfrage, ob sich biochemische Methoden

ohne weiteres auf rechtsmedizinische Belange übertragen lassen, machen?

In unseren Versuchen wurden auf 0,5 ml Acetonitrilgemisch 1 mg Histamin eingewogen. In den Gaschromatographen eingegeben wurden jeweils 2 ul, die 4 ug der zu bestimmenden Substanz enthielten. Größere Mengen als 2 ul einzugeben, hielten wir für nicht geeignet, weil dann die Gefahr einer Überladung des Detektors auftritt, und weil mit zunehmender Menge des Lösungsmittels der Histaminpeak vom Lösungsmittelpeak zugedeckt wird. Da sich so kleine Mengen wie 0,5 ml Acetonitrilgemisch schwer exakt bestimmen lassen, sollte man, um optimale Meßergebnisse zu bekommen, von mindestens 1 ml Acetonitrilgemisch ausgehen. Bei 2 ul eingegebener Menge beträgt die zu bestimmende Substanz dann 2 ug.

Im Blut einer Leiche, deren Tod nach einer kurzdauernden Agonie einsetzte, kann nach BERG eine Konzentration von 4 - 8 ug/ml vorliegen. Dieser Wert stellt eine maximale Angabe dar, denn bei den meisten Todesarten finden sich Werte von 0,5 - 3 ug/ml, also wesentlich geringere Mengen. Wir gingen davon aus, daß bei einer Leicheneröffnung auf jeden Fall 5ml Serum asserviert werden können. Sicherlich wird in vielen Fällen mehr Serum zur Bestimmung vorliegen. Wenn man aber bedenkt, daß in der Praxis nicht allein eine Histaminbestimmung durchgeführt wird, sondern das Serum auch noch für andere Bestimmungen benötigt wird, erschien uns die Menge von 5 ml als vernünftiger Ausgangswert. Es lägen dann also in 5 ml Serum, bei Annahme von 5 ug/ml, 25 ug Histamin vor, die in 1 ml Acetonitrilgemisch gelöst werden. Bei einer Eingabe von 2 ul in den Gaschromatographen müßten also 0,05 ug bestimmt werden. Die Histaminkonzentration, die im Leichenblut zu bestimmen ist, ist also mindestens 80 mal kleiner, als die in unseren Versuchslösungen bestimmte Histaminmenge.

Die Konzentrationen, die unseren Versuchen zugrunde lagen, wurden mit dem Gaschromatographen bei einer Empfindlich-

keit von E = 4 · 10^2 bestimmt. Bei der Histaminbestimmung in Leichenblut müßte die Empfindlichkeit 80 mal höher liegen. Das würde bei unserem Gaschromatographen einer Empfindlichkeit von E = 4 · 1 entsprechen, wenn man eine lineare Empfindlichkeitsanzeige voraussetzt, was wir auf Grund unserer Versuchsergebnisse konnten.

Bei einer Empfindlichkeitseinstellung von E = 4 · 1 müßte man demnach eine Anzeige des Histamins erwarten. Unsere Versuche, die im Leichenblut vorkommenden Histaminkonzentrationen zu bestimmen, scheiterten jedoch an der Tatsache, daß sich bei unserem Gerät bei der erforderlichen extremen Empfindlichkeit keine Nullinie mehr einstellen ließ. Diese Feststellung wurde uns von der Firma Hewlett & Packard bestätigt, die angab, daß bei einer Empfindlichkeit ab E = 1 · 8 bis E = 1 · 4 die Einstellung einer Nullinie bei den gegebenen Versuchsbedingungen nicht mehr möglich sei.

Es resultiert also, daß wir nicht in der Lage waren, die maximal im Leichenblut vorkommenden Histaminmengen zu bestimmen. Wenn man nun bedenkt, daß die routinemäßig zu bestimmenden Histaminwerte bis zu 10fach geringer sein können, und man bei der notwendigen Extraktion des Histamins aus dem Serum mit einer Wiederauffindquote von 20 - 30% rechnen muß, läßt sich klar erkennen, daß die Gaschromatographie zur Bestimmung von Histamin im Leichenblut in der von uns angewendeten Weise nicht die geeignete Methode ist.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einem allgemeinen Überblick über das Prinzip und den apparativen Aufbau der Gaschromatographie und ihre Auswertungsmethoden folgt eine Zusammenstellung der Literatur, die sich mit den Anwendungsmöglichkeiten der Gaschromatographie, soweit sie für rechtsmedizinische Belange interessant ist, beschäftigt. Dabei wurde die bis Anfang 1969 erschienene Literatur berücksichtigt. Die einzelnen Arbeiten wurden nach Zugehörigkeit zu größeren Stoffklassen zusammengestellt.

In einem experimentellen Teil wurde die Frage zu klären versucht, ob sich Methoden, die aufgrund rein biochemischer Fragestellungen erarbeitet wurden, ohne weiteres auf Probleme, die in der Rechtsmedizin interessant sind, übertragen lassen. In der Literatur wurden zwei einschlägige Arbeiten gefunden, von denen die eine die Untersuchung von Histamin als Reinsubstanz, die andere den Nachweis in wäßriger Lösung betrifft. Neu erarbeitet wurde von uns die gaschromatographische Bestimmung von Histamin aus Serum, das ja in der Rechtsmedizin das gegebene Ausgangsmaterial ist. Im Laufe der Versuche ergab sich jedoch, daß selbst die bei Streßreaktionen zu erwartenden Konzentrationen unter der Erfaßbarkeitsgrenze lagen.

IV. LITERATURANGABEN

BARSOUM, G.S. and J.H. GADDUM: The Pharmacological Estimation of Adenosine and Histamine in Blood
J. Physiol. 85, 1 (1935)

BERG, S.: Physiologisch-chemische Befunde im Leichenblut als Ausdruck des Todesgeschehens
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 54, 136 (1963)

BOBER, H.: Die Praxis der Gaschromatographie. I. Teil: Einführung in die Gaschromatographie
Beckman Instruments (1964)

- Fortschritte gas-chromatographischer Verfahren in der Biochemie
Z. Anal. Chem. 243, 314 (1968)

BROOKS, C.J.W. and E.C. HORNING: Gas Chromatographic Studies of Catecholamines, Tryptamines, and Other Biological Amines. I. Catecholamines and Related Compounds
Anal. Chem. 36, 1540 (1964)

BURCHFIELD, H.P. and E.E. STORRS: Biochemical Applications of Gaschromatography
Academic Press, New York and London (1962)

CODE, C.F. and F.C. MC INTIRE: Quantitative Determination of Histamine
In: Methods of Biochemical Analysis. Ed. by D. Glick Vol. III., Interscience Publ. N.Y. (1956)

CREMER, E. und R. MÜLLER: Trennung und Bestimmung von Gasen durch Chromatographie
Mikrochim. Acta 36/37, 553 (1951)

- Trennung und Bestimmung von Substanzen durch Chromatographie in der Gasphase.
Z. Elektrochem. 55, 217 (1951)

CREMER, E. und F. PRIOR: Anwendung der chromatographischen Methode zur Trennung von Gasen und zur Bestimmung von Adsorptionsenergien
Z. Elektrochem. 55, 66 (1951)

GRIMMET, M.G. and E.L. RICHARDS: Separation of Imidazoles by Cellulose Thin-Layer Chromatography
J. Chromatography 20, 171 (1965)

HORNING, E.C., M.G. HORNING, W.J.A. VAN DEN HEUVEL, K.L. KNOX, B. HOLMSTEDT and C.J.W. BROOKS: Gas Chromatographic Studies of Catecholamines, Tryptamines, and Other Biological Amines. II. Tryptamine-Related Amines and Catecholamines
Anal. Chem. 36, 1546 (1964)

GIUFFRIDA, L.: A Flame Ionization Detector Highly Selective and Sensitive to Phosphorus. A Sodium Thermionic Detector
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 47, 293 (1964)

GIUFFRIDA, L. and F. IVES: Two Gas-Chromatographic Techniques for the Determination of Organophosphate Pesticide Residues
J. Assoc. Offic. Agr. Chem. 47, 1112 (1964)

GOLD, W. und H.-D. METZGER: Prozeßrechner in der Analysentechnik
Siemenszeitschrift 43, 583 (1969)

JAMES, A.T. and A.J.P. MARTIN: Gas-Liquid Partition Chromatography. The Separation and Micro-Estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid
Biochem. J. 50, 679 (1952)

- Gas-Liquid Chromatography. The Separation and Identification of the Methyl Esters of Saturated and Unsaturated Acids from Formic Acid to n-Octadecanoic Acid
Biochem. J. 63, 144 (1956)

JENTZSCH, D., H.G. ZIMMERMANN und I. WEHLING: Über den spezifischen gaschromatographischen Nachweis von halogen- und phosphorhaltigen Verbindungen durch einen 2-Stufen-Flammenionisationsdetektor
Z. Anal. Chem. 221, 377 (1966)

JENTZSCH, D.: Gas-Chromatographie
Franckh'sche Verlagshandlung Stuttgart (1968)

KARMEN, A.: Specific Detection of Halogens and Phosphorus by Flame Ionization
Anal. Chem. 36, 1416 (1964)

- Specific Detection of Subnanogram Quantities of Organophosphorus by Flame Ionization
J. Gaschromatog. 3, 336 (1965)

KARMEN, A. and L. GIUFFRIDA: Enhancement of the Response of the Hydrogen Flame Ionization Detector to Compounds containing Halogens and Phosphorus
Nature 201, 1204 (1964)

LAVES, W.: Agonie
Münch. Med. Wschr. 1965, 113

LAVES, W. und S. BERG: Agonie
bei Schmidt-Römhild Lübeck 1965

MC INTIRE, F.C., L.W. ROTH and J.L. SHAW: Determination of Histamine by Gas Chromatography
J. Biol. Chem. 170, 537 (1947)

MARTIN, A.J.P. and R.L.M. SYNGE: A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases. 1. A Theory of Chromatography. 2. Application of the Micro-Determination of the Higher Monoamino-Acids in Proteins
Biochem. J. 35, 1358 (1941)

RUNGE, F.F.: Zur Farbenchemie
Berlin 1850

SHORE, P.A., A. BURKHALTER and V.A. COHN Jr.: A Method for the Fluorometric Assay of Histamine in Tissues
J. Pharmacol. Exp. Ther. 127, 182 (1959)

TSWETT, M.: Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen.
Ber. dtsch. bot. Ges. 24, 316 (1906)

WILLIAMS, R.J. and H. KIRBY: Paper Chromatography Using Capillary Ascent
Science 107, 481 (1948)

ZACHARIAE, H.: Histamine in Human Blood Determined by Spectrofluorimetry
Scand. J. Clin. Lab. Invest 15, 173 (1963)

Meinem verehrten Doktorvater Professor Dr. med. Wolfgang Schwerd möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung eines Themas und Laborplatzes und besonders für die stets freundliche Hilfe, die er mir gewährte, danken.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Joachim Drabner für die Betreuung der Arbeit und Professor Dr. Egon Fahr, Organisch-Chemisches Institut Würzburg, für die freundliche Beratung in chemischen Fragen.

LEBENSLAUF

Am 27. 5. 1944 wurde ich als Tochter des Stadtrechtsrates Dr. jur. Werner Langhoff und seiner Frau Annemarie geb. Geelvink in Osnabrück geboren. Mein Vater ist seit Juli 1944 vermißt. Ostern 1950 wurde ich eingeschult und besuchte von 1955 bis 1964 das Gymnasium für Mädchen in Osnabrück. Nach bestandener Reifeprüfung begann ich im Sommersemester 1964 das Medizinstudium in Göttingen, wo ich nach dem Wintersemester 1964/65 das Vorphysikum und nach dem Sommersemester 1966 das Physikum ablegte. Vom Wintersemester 1966/67 an studierte ich, mit Ausnahme eines Semesters in Wien, in Würzburg. Im Sommer 1970 habe ich mein Staatsexamen abgelegt.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere außerdem ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Gertrud Langhoff

Schnelldruck - Böhler, 87 Würzburg, Wirsbergstraße 10